

**Titre:** Contribution à la validation de la méthode in vitro gastro-intestinale (IVG) pour la détermination de la bioaccessibilité du mercure dans des matrices solides  
**Title:**

**Auteur:** Bruno Welfringer  
**Author:**

**Date:** 2008

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Welfringer, B. (2008). Contribution à la validation de la méthode in vitro gastro-intestinale (IVG) pour la détermination de la bioaccessibilité du mercure dans des matrices solides [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].  
**Citation:** PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8373/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8373/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de recherche:**  
**Advisors:**

**Programme:** Non spécifié  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CONTRIBUTION À LA VALIDATION DE LA MÉTHODE IN VITRO  
GASTRO-INTESTINALE (IVG) POUR LA DÉTERMINATION DE LA  
BIOACCESSIBILITÉ DU MERCURE DANS DES MATRICES SOLIDES

BRUNO WELFRINGER

DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE MINÉRAL)

JUILLET 2008



Library and  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-46087-0*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-46087-0*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

CONTRIBUTION À LA VALIDATION DE LA MÉTHODE IN VITRO  
GASTRO-INTESTINALE (IVG) POUR LA DÉTERMINATION DE LA  
BIOACCESSIBILITÉ DU MERCURE DANS DES MATRICES SOLIDES

présenté par : WELFRINGER Bruno

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. BARBEAU Benoît, Ph.D., président du jury

M. ZAGURY Gérald J., Ph.D., membre et directeur de recherche

M. AMYOT Marc, Ph.D., membre externe

*À mes parents...*

## REMERCIEMENTS

Ce projet est l'aboutissement d'une année et demie de travail réalisé à l'École Polytechnique de Montréal et de nombreuses personnes y ont apporté leur contribution. De la plus minime à la plus grande, elles ont toutes été importantes à mes yeux.

Mes remerciements iront donc en tout premier lieu à Gérald Zagury, professeur au Département des Génies Civil, Géologique et des Mines et directeur de recherche. Sans lui, rien de tout ceci n'aurait été possible. C'est pourquoi je tiens à le remercier grandement pour tout ce savoir qu'il a su me communiquer, son attention, son soutien et sa rigueur tout au long du projet. En tout temps il aura été disponible pour répondre à mes questions et me donner des conseils avisés.

Je souhaiterais également remercier Manon Leduc et Lucie Jean pour m'avoir encadré et aidé tout au long de la partie expérimentale. À ce sujet, un gros merci également à Carmen, Christophe, et Éric pour leurs « trucs et astuces » en laboratoire. Merci également à Lyne Lavoie pour son aide avec les commandes et les analyses.

De plus je tiens à remercier l'École des Mines de Nancy, et plus particulièrement Jean-Louis Pradier, ainsi que l'École Polytechnique de Montréal pour m'avoir permis de réaliser cet échange entre le Groupe des Écoles des Mines et l'École Polytechnique de Montréal.

Un immense merci à tous les étudiants et membres du laboratoire et de la chaire industrielle CRSNG – Polytechnique UQAT en environnement et gestion des rejets miniers, qui ont toujours su créer à la fois une atmosphère propice au travail, mais également une ambiance détendue et conviviale.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille en France pour leur soutien même s'ils n'étaient pas toujours au courant de ce que je faisais. En espérant que ce mémoire les éclaire un peu...

## RÉSUMÉ

Le mercure (Hg) est un métal qui est naturellement présent dans un grand nombre de roches ou de sols à des concentrations n'excédant généralement pas 50 ppm. On le retrouve également dans les autres compartiments de l'environnement, tels que l'air, les eaux souterraines et de surface, ainsi que le biote dans lequel il peut se bioaccumuler. Certaines activités anthropiques sont responsables de l'augmentation des concentrations de mercure, comme la combustion de ressources fossiles, les procédés industriels d'extraction de l'or, les usines chlor-alkali et la combustion des déchets ménagers... Dans l'environnement, le mercure est présent sous trois états d'oxydation : la valence 0 pour le mercure élémentaire ( $\text{Hg}^0$ ), +I pour le mercure monovalent ( $\text{Hg}^+$ ), ou +II pour le mercure divalent ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Le mercure élémentaire se retrouve essentiellement dans l'atmosphère car il est très volatil. Les formes monovalente et divalente du mercure sont associées à des groupes méthyles, ou à d'autres ions, ce qui engendre des espèces de mercure inorganiques ou organiques. Toutes les formes de mercure sont toxiques pour les humains, mais celles méthylées, sont les plus dangereuses.

Les humains peuvent être exposés au mercure par différentes voies d'exposition, comme l'inhalation d'air ou de particules, l'absorption dermique, l'ingestion de nourriture ou de sols contaminés. Chez les jeunes enfants qui jouent en extérieur et portent régulièrement leurs mains à la bouche, l'ingestion de sols contaminés est considérée comme une voie d'exposition potentielle aux métaux lourds. Plusieurs études ont montré qu'il s'agissait de la voie d'exposition principale avant même l'ingestion de nourriture contaminée en ce qui concerne le mercure total. Cependant, tout le mercure contenu dans le sol ingéré ne sera pas forcément absorbé à travers la paroi intestinale, seule la fraction biodisponible le sera. La biodisponibilité représente la fraction du contaminant absorbé qui a franchi la paroi intestinale et qui a réellement atteint la circulation systémique. Des études in vivo ont mesuré la biodisponibilité orale de contaminants comme l'arsenic, le plomb ou le cadmium, alors qu'en ce qui concerne le mercure, aucune étude n'a mené à

des résultats concluants. En raison de la complexité de telles études, et pour des raisons d'éthique et de coûts, on préfère utiliser des méthodes *in vitro* qui permettent d'évaluer la bioaccessibilité du mercure en simulant le passage du sol dans l'organisme en plusieurs phases, généralement une phase gastrique et une phase intestinale. La bioaccessibilité représente la fraction de mercure qui est soluble dans l'environnement gastro-intestinal et donc potentiellement biodisponible, ce qui est conservateur parce que la fraction qui atteindra la circulation systémique peut être surestimée. Les valeurs de bioaccessibilité peuvent ensuite servir dans l'évaluation des risques pour la santé humaine, comme pour calculer des facteurs tels que le CDI (*Chemical Daily Intake*) qui représente la dose ingérée journalière de contaminant. Ensuite, en comparant ces résultats à des doses de référence, on peut estimer si l'ingestion de sol représente un danger ou un risque pour l'enfant.

Les hypothèses de recherches pour ce projet sont : (1) la méthode *in vitro* gastro-intestinale (IVG) est plus appropriée pour déterminer la bioaccessibilité du mercure dans les sols que la méthode CDM développée par Camp Dresser & McKee ; (2) la bioaccessibilité du mercure dépend des propriétés des sols ; et (3) elle peut être reliée au fractionnement du mercure. L'objectif principal de ce projet est de contribuer à la validation de la méthode IVG pour déterminer la bioaccessibilité du mercure dans les sols. Les objectifs spécifiques sont d'évaluer l'influence des propriétés des sols et du fractionnement du mercure sur la bioaccessibilité et de comparer les deux méthodes *in vitro*. La méthode CDM a déjà été utilisée pour des composés purs, des sols de référence et des sols contaminés au mercure. La méthode *in vitro* gastro-intestinale (IVG), quant à elle, n'a jamais été utilisée pour estimer la bioaccessibilité du mercure, mais a déjà été validée par des tests *in vivo* pour d'autres contaminants (plomb, arsenic et cadmium). Pour ce projet, on a appliqué ces deux méthodes *in vitro* à deux composés purs ( $\text{HgCl}_2$  et  $\text{HgS}$ ), deux sols certifiés (CRM 025-050 et ERM<sup>®</sup>-CC580) et cinq sols naturels. L'influence des propriétés des sols et du fractionnement du mercure sur la bioaccessibilité a été étudiée en évaluant les propriétés physico-chimiques des échantillons (pH, teneur en solides volatils, contenus en carbone total, carbone



organique total, soufre total, soufre sulfate et distribution granulométrique), et les quatre fractions (soluble à l'eau, échangeable, liée à la matière organique et résiduelle) obtenues suite à une extraction séquentielle.

Les résultats ont montré que les cinq sols naturels avaient des concentrations en mercure total (2,6 à 12,2 mg/kg) dépassant le critère B (2 mg/kg) du Québec, mais faibles par rapport aux sols certifiés (82,3 mg/kg pour CRM 025-050 et 106,7 mg/kg pour ERM<sup>®</sup>-CC580). Excepté pour le CRM 025-050 qui présentait des valeurs de bioaccessibilité élevées, 37,7 % et 61,5 % pour respectivement les phases intestinales des méthodes CDM et IVG, les valeurs de bioaccessibilité pour les cinq sols naturels et le ERM<sup>®</sup>-CC580 étaient inférieures respectivement à 3,1 % et 7,5 %. Les deux phases des deux méthodes étaient fortement corrélées entre elles :  $r = 0,99$  et  $p < 0,001$  pour la phase gastrique et  $r = 0,95$  et  $p < 0,001$  pour la phase intestinale. Cependant, les valeurs ont été plus élevées dans la méthode IVG que dans la méthode CDM, pour laquelle elles étaient toutes sous la limite de détection. La principale différence entre les deux méthodes in vitro est la grande quantité de carbone organique dissous apportée par les composants de la méthode IVG, ce qui est susceptible d'entraîner la dissolution d'espèces de mercure supposées insolubles. Les propriétés des sols qui ont fortement corrélés avec la bioaccessibilité intestinale du mercure sont les contenus en soufre total ( $r = 0,98$  et  $p < 0,001$ ) et en soufre sulfate ( $r = 0,99$  et  $p < 0,001$ ). Habituellement la présence de soufre diminue la solubilité et donc la bioaccessibilité du mercure, soit en le fixant à la matière organique, particulièrement les acides humiques, ou en le piégeant sous la forme de sulfure de mercure (HgS), une espèce très insoluble. Cependant, un fort contenu en soufre sulfate a pour conséquence la formation de sulfate de mercure, forme qui est beaucoup plus soluble, ce qui entraîne des valeurs de bioaccessibilité plus importantes. Pour les deux méthodes, la bioaccessibilité intestinale était également significativement corrélée avec la somme des deux premières fractions de l'extraction séquentielle, la fraction soluble à l'eau (F1) et la fraction échangeable (F2) ( $r = 0,99$ ,  $p < 0,001$  et  $n = 5$  pour la méthode CDM ;  $r = 0,99$ ,  $p < 0,001$  et  $n = 7$  pour la méthode IVG). Ainsi

l'évaluation de ces fractions permet une bonne estimation de la bioaccessibilité gastro-intestinale.

Les méthodes *in vitro* ont donc permis d'évaluer la bioaccessibilité du mercure dans les sols contaminés qui sont ingérés par de jeunes enfants. Les deux méthodes comparées ont montré des résultats différents, mais ceux-ci ont été néanmoins fortement corrélés. Cependant, des deux méthodes, la méthode IVG est plus réaliste étant donné qu'elle simule plus précisément les conditions biochimiques du système gastro-intestinal et permet d'obtenir des résultats plus élevés que la méthode CDM. Ainsi de futurs travaux pourraient s'intéresser aux processus de dissolution et de méthylation du mercure dans le système gastro-intestinal, incluant éventuellement des microorganismes.

## ABSTRACT

Mercury (Hg) is a metal which naturally occurs in numerous rocks and soils at concentrations below 50 ppm. It can be found in other compartments of the environment such as air, surface and ground waters, and biota in which it is able to biomagnify. Some anthropogenic activities may be responsible for the increase of these mercury concentrations such as fossil fuels combustion, gold mining, chlor-alkali production, or domestic wastes combustion... In the environment, mercury occurs under three oxidation states: 0 for elemental mercury ( $\text{Hg}^0$ ), +I for monovalent mercury ( $\text{Hg}^+$ ), and +II for divalent mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Elemental mercury is mainly found in the atmosphere since its high volatility. Monovalent and divalent mercury exist only where they are associated with chemical radicals and can form inorganic or organic species. All mercury species are toxic for humans, but methyl forms are the most hazardous.

Humans can be exposed to mercury via different pathways, like air or particles inhalation, dermic absorption, contaminated-food or soil ingestion... Contaminated-soil ingestion, via the hand-to-mouth activities, is known as a major exposure pathway for children playing outside. Several studies showed that for young children this is the major exposition pathway for total mercury before contaminated-food ingestion. However all mercury present in the soil is not able to go through the intestinal membrane. Only the bioavailable fraction will be able to do so. Bioavailability represents the fraction of an absorbed contaminant that passed through the intestinal membrane and actually reached the systemic circulation. In vivo studies measured the oral bioavailabilities of contaminants like arsenic, lead, or cadmium. Regarding mercury, no in vivo studies has ever provided conclusive bioavailability results. Since in vivo studies are challenging to implement, and for ethical and cost reasons, in vitro studies are much more used. They enable to assess the contaminant bioaccessibility by simulating the passage of the soil in the human organism in two phases, usually a gastric phase and an intestinal phase. Bioaccessibility represents the fraction of mercury which is soluble from the soil in the

gastrointestinal tract and so potentially bioavailable. Bioaccessibility results are conservative since the fraction which passes through the intestinal membrane may be overestimated. Bioaccessibility values can then be used for assessment on human health risks, like in the determination of the Chemical Daily Intake (CDI), which represents the daily ingested dose. Then the potential hazard of a contaminated soil to a child can be assessed by comparing this index with references doses or critical values.

The research hypotheses of this project are: (1) in vitro gastrointestinal (IVG) method is more appropriate to assess mercury bioaccessibility in soils compared to CDM method; (2) bioaccessibility is dependant from the soil properties; and (3) can be related to mercury fractionation. The main goal of this project is to contribute to the validation of the IVG method for determination of mercury bioaccessibility in soils. The specific goals are to evaluate the influence of mercury fractionation and soil properties on mercury bioaccessibility, and to compare the two in vitro methods (CDM and IVG methods). The CDM method has already been performed for mercury contaminated soils and validated by using pure Hg compounds and reference materials. The in vitro gastrointestinal method (IVG) has never been applied on mercury contaminated soils, but has already been used and validated by in vivo methods for other contaminants (arsenic, lead, and cadmium). IVG method was performed on two pure Hg compounds ( $\text{HgCl}_2$  and  $\text{HgS}$ ), two reference materials (CRM 025-050 and ERM<sup>®</sup>-CC580) and five field-collected soils. Bioaccessibility values were compared to results from a previous study using the CDM method. In order to assess the influence of soil properties and mercury fractionation on bioaccessibility, reference materials and field-collected soils were characterized (pH, volatile solids, total carbon, total organic carbon, total sulphur, sulphate content, particle-size distribution), and a sequential extraction was performed to split up mercury in four fractions: water soluble, exchangeable, organic-bound, and residual.

Total mercury concentrations in the five field-collected soils ranged from 2.6 to 12.2 mg/kg, which is more than the Quebec B criteria, and were low compared to total mercury concentrations in the reference materials (82.3 mg/kg for CRM 025-050 and

106.7 mg/kg for ERM<sup>®</sup>-CC580). Except for mercury bioaccessibility values in CRM 025-050 which were high, 37.7% and 61.5% in the intestinal phase of the CDM method and the IVG method respectively, mercury bioaccessibility values in the five field-collected soils and ERM<sup>®</sup>-CC580 were low, less than 3.1% and 7.5% respectively. Both phases for both methods were highly correlated ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$  for gastric phase, and  $r = 0.95$ ,  $p < 0.001$  for intestinal phase). However the bioaccessibility values were much higher for the IVG method than for the CDM method in which they were all below detection limit. The major difference between the two methods in the dissolved organic carbon brought by the addition of the IVG components, and this may enhance the dissolution of usually insoluble expected mercury species. The soil properties well correlated with bioaccessibility were totals sulphur ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.001$ ) and sulphate content ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ). Usually, the presence of sulphur decreases mercury solubility, and bioaccessibility, by fixing it on organic matter, especially humic acids, or by trapping it under the extremely insoluble form of mercuric sulphide (HgS). However a high sulphate content enables the formation of mercuric sulphate, which is a more soluble species, leading to higher bioaccessibility values. For both methods, intestinal bioaccessibility strongly correlated with the sum of the two first fractions of the sequential extraction procedure, water-soluble (F1) and exchangeable (F2) ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ , and  $n = 5$  for CDM method;  $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ , and  $n = 7$  for IVG method). The evaluation of these fractions is a good indicator for bioaccessibility.

In vitro methods enabled to assess mercury bioaccessibility in ingested soils by young children. The two studied methods showed different results but were still highly correlated. However, the IVG method is more realistic since it is a more physiologically based method, and provide higher results than the CDM method. Future works may be interested in understanding dissolution and méthylation processes in the gastrointestinal tract may still be understood by using micro organisms.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>v</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xx</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1    Problématique .....	1
1.2    Hypothèses de recherche et objectifs .....	3
1.2.1    Hypothèses de recherche.....	3
1.2.2    Objectifs .....	3
1.3    Organisation du mémoire.....	4
<b>CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>5</b>
2.1    Sources de mercure .....	5
2.1.1    Sources naturelles du mercure dans les sols .....	5
2.1.2    Sources anthropogéniques du mercure.....	6

2.2	Espèces de mercure, leurs caractéristiques et leurs propriétés.....	7
2.2.1	Différentes espèces de mercure.....	7
2.2.2	Propriétés physico-chimiques des espèces de mercure.....	8
2.2.3	Composés inorganiques de mercure dans l'environnement.....	9
2.2.4	Composées organiques de mercure dans l'environnement.....	11
2.3	Répartition du mercure dans l'environnement.....	12
2.3.1	Mercure dans l'eau, le biote et l'air .....	13
2.3.2	Mercure dans les sols et les sédiments.....	15
2.3.3	Cycle du mercure .....	18
2.4	Biodisponibilité, bioaccessibilité et analyse de risque.....	19
2.4.1	Définitions et concepts de biodisponibilité et de bioaccessibilité.....	19
2.4.2	Évaluation des risques pour la santé humaine.....	21
2.4.3	Toxicité du mercure et doses de référence.....	23
2.4.4	Risques pour des enfants exposés à des sols contaminés au mercure.....	25
2.5	Méthodes de mesure de biodisponibilité et de bioaccessibilité .....	27
2.5.1	Études in vivo pour déterminer la biodisponibilité du mercure.....	27
2.5.2	Études in vitro pour déterminer la bioaccessibilité du mercure.....	28
2.5.3	Besoins des études de biodisponibilité.....	30
2.5.4	Description et comparaison des protocoles in vitro .....	30
2.6	Paramètres géochimiques influençant la biodisponibilité du mercure.....	32
2.6.1	Influence du pH.....	33
2.6.2	Influence de l'adsorption dans les sols.....	33
2.6.3	Influence du soufre et des chlorures.....	34
2.6.4	Influence des réactions biochimiques des espèces de mercure.....	35
<b>CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE .....</b>		<b>36</b>
3.1	Matériaux de travail .....	36
3.2	Propriétés des sols étudiés.....	37

3.3	Fractionnement du mercure .....	38
3.4	Bioaccessibilité du mercure .....	38
3.5	Analyses statistiques .....	39
3.6	Modélisation géochimique .....	39
3.7	Publication des résultats .....	40

**CHAPITRE 4 EVALUATION OF TWO IN VITRO PROTOCOLS FOR  
DETERMINATION OF MERCURY GASTROINTESTINAL  
BIOAVAILABILITY: INFLUENCE OF MERCURY FRACTIONATION  
AND SOIL PROPERTIES.....41**

4.1	Title .....	41
4.2	Author and co-author .....	41
4.3	Abstract .....	41
4.4	Introduction .....	42
4.5	Experimental Section .....	44
4.5.1	Samples and pretreatment .....	44
4.5.2	Soil characterization.....	44
4.5.3	Total mercury and volatile mercury .....	45
4.5.4	Sequential extraction procedure .....	46
4.5.5	Bioaccessibility methods.....	46
4.5.6	Geochemical modeling with VMINTEQ .....	49
4.5.7	Quality and statistical analyses .....	49
4.6	Results and discussion .....	50
4.6.1	Soil physicochemical characterization.....	50
4.6.2	Total mercury and mercury fractionation .....	50
4.6.3	Bioaccessibility results.....	51
4.6.4	Influence of soil properties and Hg fractionation on bioaccessibility.....	53



4.6.5	Comparison of the two in vitro methods and influence of DOC on Hg bioaccessibility .....	54
4.7	Acknowledgments.....	56
4.8	References .....	56
<b>CHAPITRE 5 DISCUSSIONS GÉNÉRALES ET CONCLUSIONS.....</b>		<b>65</b>
<b>CHAPITRE 6 RECOMMANDATIONS .....</b>		<b>69</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>72</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>81</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 - Le mercure et ses principaux composés (Thomassin & Touze, 2003) .....	8
Tableau 2.2 - Propriétés physico-chimiques du mercure et de ses composés (Pichard, 2006) .....	10
Tableau 2.3 - Concentrations du mercure dans l'environnement (Pichard, 2006).....	13
Tableau 2.4 - Valeurs normales de référence du Hg total chez l'homme (WHO-IPCS, 1976) .....	24
Tableau 2.5 : Valeurs toxicologiques de référence (Pichard, 2006) .....	24
Tableau 2.6 - Mesures de bioaccessibilité par la méthode CDM pour les deux études...	29
Tableau 2.7 - Principales caractéristiques des trois méthodes in vitro CDM, IVG et SBRC .....	31
Table 4.1 – Physicochemical properties, particle size distribution, and USDA classification of the two reference materials and the five field-collected soils (n = 3)....	61
Table 4.2 - Total Hg, volatile Hg, and Hg fractionation for the 2 reference materials and the five field-collected-soils (<2 mm) (n = 3) .....	62
Table 4.3 – Bioaccessibility on pure Hg compounds, reference materials and field-collected soils (<250 µm fraction) using two different in vitro methods (n = 3).....	63

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 - Répartition des émissions de mercure dans l'environnement (Stein et al., 1996) .....	7
Figure 2.2 - Diagramme Eh-pH pour le mercure (Andersson, 1979) .....	12
Figure 2.3 - Cycle du mercure dans l'environnement et principales transformations (Stein et al., 1996) .....	18
Figure 4.1 - Principal Component Analysis applied to soil properties, sum of fractions F1+F2, and intestinal IVG bioaccessibility (n = 7).....	64
Figure 6.1 - Montage de la méthode CDM .....	82
Figure 6.2 - Montage de la méthode IVG .....	84
Figure 6.3 - Disposition des instruments utilisés pour la méthode IVG .....	84

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1 – Description des méthodes in vitro CDM, IVG et SBRC .....	81
Annexe 2 – Article soumis en tant que co-auteur .....	86

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

- ACS American Chemical Society (Société Américaine de Chimie)
- AF (ou FA) Acides Fulviques
- AH (ou HA) Acides Humiques
- As Arsenic
- AT Temps moyen d'exposition
- ATSDR Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (Agence pour le Registre des Substances Toxiques et Maladies)
  
- BDA Biodisponibilité Absolue
- BDR Biodisponibilité Relative
- BW Body Weight (Masse corporelle)
  
- Cd Cadmium
- CDI Chemical Daily Intake (Ingestion journalière de produit chimique)
- CDM Camp Dresser and Mc Kee (méthode CDM)
- CEC Capacité d'Échange Cationique
- CF Facteur de conversion
- COD (ou DOC) Carbone Organique Dissous
- COT (ou TOC) Carbone Organique Total
- CRM Certified Reference Material (Matériel de Référence Certifié)
- CS Concentration dans le sol
- CSF Cancer Slope Factor (Facteur de Pente de Cancer)
- CT (ou TC) Carbone Total
- CVAAS Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry (Spectrométrie par Absorption Atomique de Vapeur Froide)
  
- DMeHg Diméthylmercure

- ED Durée d'exposition
- EF Fréquence d'exposition
- ERM European Reference Material (Matériel Européen de Référence)
- F1 Fraction 1 : mercure soluble à l'eau
- F2 Fraction 2 : mercure échangeable
- F3 Fraction 3 : mercure lié à la matière organique
- F4 Fraction 4 : mercure résiduel
- Hg Mercure
- $\text{Hg}^+$  ou Hg(I) Mercure monovalent
- $\text{Hg}^0$  Mercure élémentaire
- $\text{Hg}^{2+}$  ou Hg(II) Mercure divalent
- $\text{HgCl}_2$  Chlorure de mercure
- $\text{HgS}$  Sulfure de mercure
- HI Hazard Index (Indice de Danger)
- HSDB Hazardous Substances Data Bank (Banque de Données des Substances Dangereuses)
- IC Ionic Chromatography (Chromatographie Ionique)
- ICP-MS Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse Couplée à un Plasma Inductif)
- INERIS Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
- IR Taux d'ingestion
- IRIS Integrated Risk Information System
- IVG In Vitro Gastro-intestinal (méthode IVG)
- $K_d$  Coefficient de partage sol/eau
- $K_{ow}$  Coefficient de partage octanol/eau
- $K_p$  Coefficient de partage matières en suspension/eau

- M Molaire (mol/l)
- MDDEP Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec
- MeHg Méthylmercure
- MO (ou OM) Matière organique
- NSERC National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Conseil National de la Science et de la Recherche en Ingénierie du Canada)
- OMS Organisation Mondiale de la Santé
- Pb Plomb
- PCA Principal Components Analysis
- ppm Parties Par Million
- RAF Facteur d'absorption relative, valant la bioaccessibilité
- RfD Reference Dose (Dose de Référence)
- SBRC Solubility/Bioavailability Research Consortium (Consortium de la Recherche sur la Solubilité/Biodisponibilité)
- ST (ou TS) Soufre Total
- Sulf Soufre Sulfate
- USDHHS United States Department of Health and Human Services (Département de la Santé et des Services Humains des USA)
- USEPA United States Environment Protection Agency (Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis)
- WHO-IPCS World Health Organization – International Programme on Chemical Safety (Organisation Mondiale de la Santé – Programme International de la Sécurité Chimique)

## AVANT-PROPOS

Ces travaux de recherche s'inscrivent dans une suite logique d'études, menées par le professeur Gérald J. Zagury, portant sur le mercure, sa spéciation, son fractionnement, sa bioaccessibilité, ainsi que sa toxicité. En 2005, avec une étudiante en maîtrise, Carmen Neculita, ils publiaient un article dans la revue *Journal of Environmental Quality* sur la détermination du fractionnement du mercure à l'aide d'une nouvelle procédure d'extraction séquentielle (Neculita *et al.*, 2005). En 2006, toujours avec la même étudiante et également dans le cadre de sa maîtrise, ils publiaient un second article dans la revue *Environmental Toxicology and Chemistry* sur le fractionnement du mercure, mais également sur sa biodisponibilité et son écotoxicité (Zagury *et al.*, 2006). Par la suite, des études ont été menées sur la biodisponibilité et la bioaccessibilité d'autres métaux ou métalloïdes, comme le cuivre ou l'arsenic. Suite aux travaux de Priscilla Pouschat et d'Éric Girouard, deux articles, portant sur la bioaccessibilité de l'arsenic et la méthode *in vitro* gastro-intestinale IVG, ont été publiés respectivement dans *Environmental Science & Technology* (Pouschat & Zagury, 2006) et *The Science of the Total Environment* (Girouard & Zagury, 2008). Dans le cadre d'une autre maîtrise de l'étudiant Christophe Bedeaux, une étude a été réalisée sur la bioaccessibilité du mercure estimée par une autre méthode *in vitro*, la méthode CDM, qui a donné lieu à la soumission d'un article dans la revue *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (Zagury *et al.*, 2008). La méthode IVG ayant déjà été validée pour l'arsenic, mais n'ayant jamais servi pour le mercure, l'idée est alors venue de tester l'application de la méthode IVG pour déterminer la bioaccessibilité du mercure dans des sols contaminés et de comparer les résultats de bioaccessibilité entre les deux méthodes *in vitro*. C'est ainsi qu'est né ce projet.



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Problématique

Le mercure (Hg) fait partie de la famille des métaux de transition, et il est le seul métal qui soit liquide à température et pression ambiantes. On le retrouve partout dans l'environnement, dans les roches où il peut être prisonnier des structures cristallines, dans l'atmosphère où il se trouve principalement sous sa forme élémentaire ( $\text{Hg}^0$ ), dans les eaux, les sols et dans la chaîne alimentaire. Les émissions naturelles de mercure dans l'atmosphère proviennent principalement de l'érosion des roches ou des éruptions volcaniques qui dégagent du mercure. Actuellement les émissions anthropogéniques de mercure dans l'environnement sont en hausse (Lindqvist *et al.*, 1991). Celles-ci proviennent principalement de la combustion des ressources fossiles et de différents procédés industriels comme les exploitations minières d'or qui consomment du mercure et les usines chlore-alkali qui utilisent le mercure dans la production de produits caustiques et de chlore. En 2000, ces émissions anthropogéniques représentaient 2190 tonnes de mercure rejetées principalement dans l'atmosphère (Pacyna *et al.*, 2006). Cependant, une fois dans l'atmosphère, le mercure est susceptible de retomber sur les sols et d'être soumis à de nombreux processus de transformation et de transport.

L'ingestion accidentelle de sols contaminés par les jeunes enfants lorsqu'ils jouent à l'extérieur et portent leurs mains à leur bouche est une voie d'exposition potentielle pour les composés chimiques toxiques (USEPA, 1997; Pouschat & Zagury, 2006). Dépendamment des espèces de mercure ingérées, les conséquences sur l'organisme ne sont pas les mêmes, mais peuvent affecter de manière permanente le système nerveux, le cerveau, les reins et/ou les poumons (Goldman & Shannon, 2001). De même les voies d'exposition différeront selon les formes de mercure. En effet, le mercure élémentaire, étant extrêmement volatile, entrera plutôt dans l'organisme par inhalation, alors que le mercure divalent sera plutôt adsorbé sur les particules de sol et donc entrera dans

l'organisme principalement par ingestion. Une étude a déjà évalué le risque que représente l'ingestion de sols contaminés au mercure pour la santé des enfants, et a trouvé que cela pouvait contribuer jusqu'à 80 % de la dose journalière acceptable (Nusslein *et al.*, 1995; Barnett & Turner, 2001).

Cependant le risque que représente un contaminant est nuancé par sa biodisponibilité orale qui représente la fraction qui a été absorbée dans le système gastro-intestinal à partir d'un sol et qui a atteint la circulation systémique. Celle-ci peut être obtenue par des test *in vitro* qui mesurent la proportion de mercure total qui est soluble dans les conditions gastro-intestinales (bioaccessibilité) et donc qui sera potentiellement disponible pour absorption à travers la membrane intestinale (Ruby *et al.*, 1999). Plusieurs études ont déjà publié des résultats sur la biodisponibilité orale évaluée par des méthodes *in vivo*, mais pour des contaminations autres que le mercure (arsenic, plomb, cadmium). Les deux seules études *in vivo* concernant le mercure n'ont pas permis d'obtenir des biodisponibilités valides et utilisables pour faute de limitations au niveau de la conception des protocoles (modèle animal, variabilité...) (Revis *et al.*, 1990; Sheppard *et al.*, 1995). C'est pourquoi, en l'absence de données *in vivo*, on doit se concentrer sur les méthodes *in vitro* qui tendent à reproduire les conditions gastro-intestinales en laboratoire. En utilisant des composés purs de mercure, des sols certifiés ou en comparant plusieurs méthodes, on peut aider à la validation de méthodes *in vitro*. La méthode gastro-intestinale publiée par Barnett et Turner (2001) (appelée méthode CDM) entreprend de recréer les passages successifs via l'estomac et l'intestin en jouant sur les conditions de pH. Une autre méthode (appelée méthode IVG), qui simule de manière plus réaliste le système gastro-intestinal d'un enfant (température, fluides gastro-intestinaux et ratio solide:liquide plus réalistes), a déjà été validée par des résultats *in vivo* pour des contaminants tels que l'arsenic, le plomb ou le cadmium (Rodriguez *et al.*, 1999; Ruby, 2004; Schroder *et al.*, 2004).

Ainsi, le but de ces travaux consiste à tester et comparer les deux méthodes *in vitro* gastro-intestinales (CDM et IVG) pour deux composés purs ( $\text{HgCl}_2$  et  $\text{HgS}$ ), deux matériaux certifiés (CRM 025-050 qui est un sol et ERM<sup>®</sup>-CC580 qui est un sédiment)

et cinq matrices naturelles. Les deux premiers sols ont été prélevés à proximité d'usines chlore-alkali situées dans l'Est du Canada. Les trois autres échantillons sont des résidus miniers de mines d'or, l'une québécoise et l'autre néo-écossaise. Les propriétés physico-chimiques de chaque échantillon ont été analysées : pH, teneur en solides volatils, contenus en carbone total, carbone inorganique total, soufre total, soufre sulfate et distribution granulométrique. Le fractionnement du mercure a également été étudié grâce à une procédure d'extraction séquentielle développée par Neculita et al. (2005). Ces protocoles et des analyses statistiques permettront d'évaluer l'influence du fractionnement du mercure et des propriétés des sols sur la bioaccessibilité.

## **1.2      Hypothèses de recherche et objectifs**

### ***1.2.1      Hypothèses de recherche***

Ce projet de recherche repose sur plusieurs hypothèses :

- La méthode IVG est plus appropriée que la méthode CDM pour évaluer la bioaccessibilité du mercure dans les sols, étant donné qu'elle est bien plus représentative du système gastro-intestinal d'un enfant et qu'elle est plus pratique à mettre en œuvre.
- La bioaccessibilité du mercure dépend des propriétés des sols que l'on étudie : pH, teneur en matière organique, contenus en carbone total, carbone organique, soufre total, soufre sulfate...
- La bioaccessibilité du mercure dans les sols est reliée au fractionnement du mercure, notamment aux phases soluble et échangeable.

### ***1.2.2      Objectifs***

L'objectif principal de ce projet est de contribuer à la validation de la méthode in vitro gastro-intestinale IVG pour déterminer la bioaccessibilité du mercure dans les sols

contaminés, en la comparant avec la méthode CDM, pour des composés purs de mercure, des échantillons certifiés et cinq sols naturels.

Les différents objectifs du projet sont :

- Déterminer la bioaccessibilité du mercure dans les sols certifiés et les sols contaminés à l'aide des méthodes CDM et IVG;
- Évaluer l'influence des propriétés des sols contaminés (pH, teneurs en solides volatils, contenus en carbone total, carbone organique, soufre total, soufre sulfate, granulométrie...) sur la bioaccessibilité du mercure;
- Déterminer les relations entre le fractionnement et la bioaccessibilité du mercure par les méthodes gastro-intestinales;
- Comparer les résultats de bioaccessibilité du mercure pour les deux méthodes gastro-intestinales, CDM et IVG.

### **1.3 Organisation du mémoire**

Cette première partie présente la problématique environnementale associée aux contaminations des sols par le mercure, ainsi que les hypothèses de recherche et les objectifs de l'étude. La seconde partie expose une courte revue de littérature présentant l'état actuel des connaissances sur le mercure, son origine, sa répartition dans l'environnement, sa biodisponibilité, sa toxicité, etc. Une brève troisième partie décrit rapidement les démarches pour l'ensemble du travail de recherche. Un article scientifique, soumis dans la revue *Environmental Science & Technology* le 19 juin 2008, résumant mes différents travaux et résultats de recherche, constitue la quatrième partie. Enfin, une partie de discussions générales et conclusions, ainsi qu'une partie de recommandations sur de possibles travaux futurs pour compléter cette étude, sont présentées en fin de mémoire.

## CHAPITRE 2

### REVUE DE LITTÉRATURE

Le mercure (Hg), élément n°80 dans la classification périodique de Mendeleïev, est un métal dit de transition qui possède des caractéristiques physico-chimiques particulières, notamment la propriété d'être liquide à température et pression ambiantes. Cette revue de littérature présente quelques notions sur les connaissances actuelles concernant le mercure, notamment son origine, sa répartition dans l'environnement, ses formes chimiques et les paramètres influençant sa spéciation, sa toxicité, sa biodisponibilité et l'évaluation des risques pour la santé humaine.

#### 2.1 Sources de mercure

Le mercure se trouve à l'état naturel dans certains minéraux, mais peut également provenir de procédés industriels.

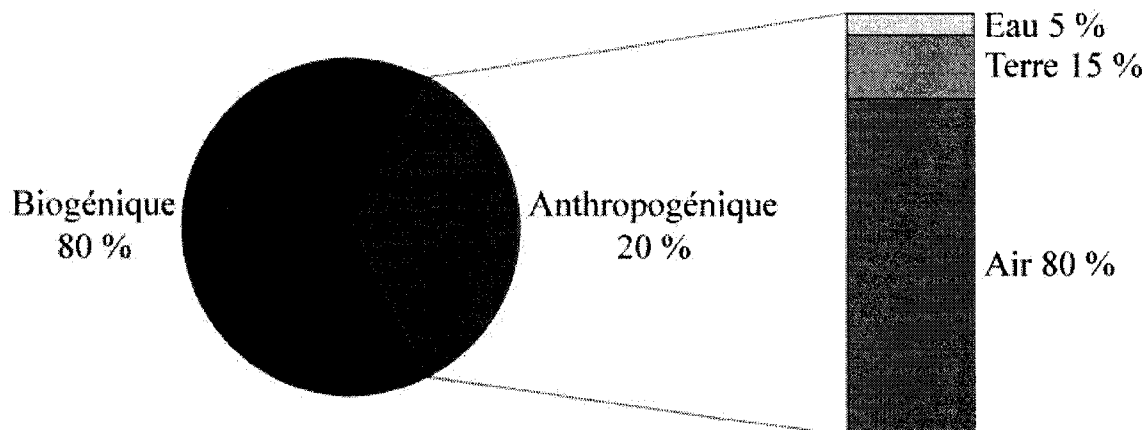
##### 2.1.1 *Sources naturelles du mercure dans les sols*

À l'origine, les atomes de mercure se retrouvent à l'intérieur des minéraux constituant les sols ou les roches et sont emprisonnés dans des structures cristallines. Cependant, l'érosion et l'altération des roches peuvent relâcher du mercure, celui-ci devenant alors disponible et pouvant intervenir dans des processus géochimiques ou biologiques. La concentration moyenne dans divers minéraux a été mesurée à environ 21 ng/g et celle dans les roches sédimentaires à environ 25 à 1430 ng/g (1934). On considère toutefois que la concentration moyenne pour les roches et les sols est inférieure à 50 ng/g, et dans de nombreux cas elle se rapproche plus de 10 ng/g (Andersson, 1979). On constate également que les sols fins, notamment s'ils sont constitués de matière argileuse, présentent des teneurs plus élevées en mercure, surtout lorsque le contenu en matière organique est élevé (Stein *et al.*, 1996). Les concentrations en mercure seront donc plus élevées dans les sols argileux et/ou organiques.

Le mercure est également présent dans l'atmosphère sous sa forme élémentaire ( $\text{Hg}^0$ ) et est donc susceptible de rejoindre les sols par déposition sèche ou via les précipitations. Des études ont montré que la concentration de mercure dans l'atmosphère varie globalement entre 1 et 20  $\text{ng/m}^3$  (Stein *et al.*, 1996). Cependant des concentrations plus importantes (30 à 1600  $\text{ng/m}^3$ ) peuvent être retrouvées au-dessus des minéraux contenant du mercure, indiquant que le mercure peut se volatiliser à partir de la croûte terrestre (Jonasson & Boyle, 1971). D'autres phénomènes contribuent également à l'apport de mercure dans l'atmosphère comme l'activité volcanique ou la volatilisation du mercure contenu dans des eaux contaminées. Une fois dans l'atmosphère, une partie du mercure peut passer en solution dans les eaux de pluie ou la neige et ainsi retourner au niveau des sols et des eaux de surface. Suivant plusieurs études, une concentration moyenne de 5 à 100  $\text{ng/l}$  dans les eaux de pluie et la neige a été jugée raisonnable (Steffen *et al.*, 2008).

### 2.1.2 Sources anthropogéniques du mercure

D'après Pacyna *et al.* (2006), les émissions anthropogéniques dans l'atmosphère en 2000 se sont élevées à environ 2190 tonnes de mercure, réparties entre la combustion de ressources fossiles (2/3) et divers procédés industriels (1/3) comme l'extraction de l'or, les productions des usines chlore-alkali, la combustion de déchets ménagers... Environ 60 % de ces émissions de mercure anthropogéniques sont constituées de mercure élémentaire ( $\text{Hg}^0$ ), 30 % d'espèces de mercure divalent ( $\text{Hg}^{\text{II}}$ ), et environ 10 % sont constitués par du mercure particulaire. Les émissions dans l'atmosphère représentent environ 80 % des émissions anthropogéniques. Quinze autres pourcents se retrouvent directement dans les sols via l'utilisation de pesticides, fongicides ou fertilisants contenant du mercure. Finalement, les cinq derniers pourcents représentent les déversements d'effluents contenant du mercure dans les rivières (Stein *et al.*, 1996). La **Figure 2.1** récapitule cette distribution.



**Figure 2.1 - Répartition des émissions de mercure dans l'environnement (Stein *et al.*, 1996)**

Les sols des sites industriels qui ne sont plus opérationnels peuvent également être des endroits où l'on retrouve des émissions et/ou des concentrations élevées de mercure (Lindberg, 1987). Par exemple, Bernaus *et al.* (2006) ont mesuré des concentrations de mercure allant jusqu'à 1150 mg/kg dans un sol à proximité d'une usine chlore-alkali, et Neculita *et al.* (2005) ont rapporté des concentrations allant jusqu'à 11500 mg/kg dans des dépôts alluviaux également prélevés à proximité d'une usine chlore-alkali.

À cause des propriétés et des demi-vies différentes pour chaque espèce de mercure, il est difficile d'avoir une vue d'ensemble des phénomènes d'émissions à l'échelle de la planète (Fitzgerald *et al.*, 1991). Aujourd'hui, les chercheurs s'accordent à dire que les émissions anthropogéniques de mercure à l'échelle globale sont en augmentation (Selin *et al.*, 2008). Le sous-chapitre suivant présente les différentes espèces de mercure ainsi que leurs propriétés.

## **2.2 Espèces de mercure, leurs caractéristiques et leurs propriétés**

### **2.2.1 *Différentes espèces de mercure***

Dans l'environnement, on peut retrouver le mercure sous deux formes, organique et inorganique. Les espèces inorganiques se composent de mercure sous les trois états d'oxydation (0, +I ou +II), tandis que les espèces organiques ne se composent que de

mercure ayant une valence de +I ou +II. La forme inorganique de valence nulle,  $\text{Hg}^0$ , est la plus abondante dans l'environnement. Les autres principaux composés du mercure (organiques et inorganiques) sont présentés dans le **Tableau 2.1** avec leur définition, leur formule chimique et des exemples.

**Tableau 2.1 - Le mercure et ses principaux composés (Thomassin & Touze, 2003)**

<i>Terme principal</i>	<i>Autre terme utilisé</i>	<i>Définition</i>	<i>Formule</i>	<i>Exemple</i>
<b>Mercure élémentaire</b>	État fondamental du mercure	Mercure de valence 0	$\text{Hg}^0$ ou $\text{Hg} (0)$	
<b>Mercure divalent</b>	Ions mercuriques libres	Mercure de valence +II	$\text{Hg}^{2+}$ ou $\text{Hg} (\text{II})$	
<b>Composé mercurieux</b>	Sel, élément, produit mercurieux	Composé mercuriel de valence +I	$\text{Hg} (\text{I})$	$\text{HgCl}$ ou $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ (calomel)
<b>Composé mercurique</b>	Sel, élément, produit mercurique	Composé mercurique de valence +II	$\text{Hg} (\text{II})$	$\text{Hg}(\text{OH})_2$ , $\text{HgCl}^+$ , $\text{HgCl}_2$
<b>Composé organique du mercure</b>	Mercure organique ou organométallique ou organomercuriel	Le composé possède au moins du mercure et un groupement organique	$\text{Hg} (\text{II})$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ , $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , complexes humiques
• <i>Dérivé mercuriel méthylé</i>	Mercure méthylé	Le composé possède au moins du mercure et un groupe méthyl ( $\text{CH}_3$ )	$\text{Hg} (\text{II})$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , $\text{CH}_3\text{HgOH}$ ,
• <i>Dérivé mercuriel diméthylé</i>	Mercure diméthylé	Le composé possède au moins du mercure et un groupe diméthyl ( $(\text{CH}_3)_2$ )	$\text{Hg} (\text{II})$	$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$
• <i>Méthylmercure MeHg</i>	Monométhylmercure MMHg	$\text{CH}_3\text{Hg}$	$\text{Hg} (\text{II})$	$\text{CH}_3\text{Hg}$
<b>Composés inorganiques du mercure</b>	Complexe, sel, mercure inorganique	Le composé possède au moins du mercure et un élément inorganique	$\text{Hg} (\text{II})$	$\text{HgS}$ , $\text{HgCl}^+$ , $\text{HgCl}_2$ , $\text{HgOH}^+$

Le mercure est également capable de s'agglomérer avec des particules d'argile ou de matière organique en suspension pour former le mercure dit « particulaire », que l'on retrouve dans l'eau et dans les sols (Stein *et al.*, 1996).

### 2.2.2 Propriétés physico-chimiques des espèces de mercure

Le mercure est le seul métal qui soit liquide à température ambiante ( $-10^\circ\text{C}$  à  $40^\circ\text{C}$ ) et qui se divise en fines gouttelettes sous agitation. Il est extrêmement volatil et se combine



facilement aux autres métaux (par amalgames) ou aux composés soufrés organiques ou inorganiques. Enfin, c'est un métal dit « lourd », car il possède une masse atomique d'environ 200 g/mol et une masse volumique d'environ 13,6 g/cm<sup>3</sup>. Le **Tableau 2.2** résume les principales propriétés physico-chimiques du mercure élémentaire (Hg<sup>0</sup>), du chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>), inorganique, ainsi que du chlorure de méthylmercure (CH<sub>3</sub>HgCl), organique. Il regroupe des propriétés physiques comme la tension de vapeur, la densité, mais également des coefficients de diffusion et de partage entre l'eau, le sol ou les sédiments (Pichard, 2006).

### 2.2.3 *Composés inorganiques de mercure dans l'environnement*

Tel que vu précédemment, dépendamment des conditions d'oxydoréduction, le mercure inorganique peut se trouver sous trois états d'oxydation, Hg<sup>0</sup>, Hg<sup>+</sup> et Hg<sup>2+</sup>. Les deux derniers n'existent pas dans l'environnement, car ils sont très instables et ont donc tendance à se complexer avec d'autres ions. Par exemple, Hg<sup>2+</sup> ne se retrouvera jamais seul, mais aura tendance à se complexer avec les ions Cl<sup>-</sup> ou OH<sup>-</sup>. En plus des réactions chimiques, il peut également y avoir des transformations du mercure par l'activité microbienne. C'est pourquoi les espèces de mercure dépendent de différentes conditions physico-chimiques, telles que le pH, la teneur en sel, ou la composition de la solution. Ces transformations sont donc primordiales, car suivant la forme sous laquelle se trouve le mercure, sa mobilité, sa solubilité ou son adsorption dans les sols varieront. Les complexes inorganiques de mercure sont fortement retenus dans les couches supérieures des sols contenant de la matière organique. Lorsque la teneur en matière organique est peu élevée, le transport ou le lessivage des complexes de mercure a lieu lorsque les conditions de pH et de pCl<sup>-</sup> sont favorables à la formation des complexes en Cl<sup>-</sup>, qui sont très solubles (Andersson, 1979).

**Tableau 2.2 - Propriétés physico-chimiques du mercure et de ses composés (Pichard, 2006)**

<i>Propriété (unité)</i>	<i>Type de composé</i>	<i>Valeur</i>	<i>Étendue</i>	<i>Référence</i>
<i>Masse molaire (g/mol)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	200,59		
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	271,52		(HSDB, 1998) (ATSDR, 1999)
	Organique CH <sub>3</sub> HgCl	251,1		
<i>Température d'ébullition (°C) à pression ambiante</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	356,7	356,6 – 356,9	(HSDB, 1998)
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	302	302 – 304	(ATSDR, 1999)
<i>Pression de vapeur (Pa)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	0,17 (20°C)	0,16 – 0,27 (20 - 25°C)	
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	0,009 à 20°C		(Schroeder <i>et al.</i> , 1989)
	Organique CH <sub>3</sub> HgCl	1,8 à 25°C		
<i>Densité</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	13,546 à 20°C		(Lide, 1998)
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	5,4 à 20°C		(Ullmann, 1990)
	Organique CH <sub>3</sub> HgCl	4,06 à 25°C		(ATSDR, 1999)
<i>Tension superficielle (N/m)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	485.10 <sup>-3</sup> (25°C)	(484 - 485).10 <sup>-3</sup> (25°C)	(HSDB, 1998)
<i>Viscosité dynamique (Pa.s)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	1,55.10 <sup>-3</sup> (20°C)	(1,52 – 1,55).10 <sup>-3</sup> (20 - 25°C)	(Lide, 1998)
<i>Solubilité dans l'eau (mg/L)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	56,7.10 <sup>-3</sup> (20°C)	(49,6 – 63,9).10 <sup>-3</sup>	
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	69 000 (20°C)	66 000 - 72 000	(Schroeder <i>et al.</i> , 1989) (HSDB, 1998)
	Organique CH <sub>3</sub> HgCl	6 000 (25°C)	5 000 - 6 000	
<i>Coefficient de partage octanol – eau : K<sub>ow</sub></i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	4,2		
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	0,5	0,5 – 3,3	(Schroeder <i>et al.</i> , 1989)
	Organique CH <sub>3</sub> HgCl	2,5	1,7 – 2,5	
<i>Coefficient de partage sol – eau : K<sub>d</sub> (l/kg)</i>	Hg total	170	19 - 300	(Buchter <i>et al.</i> , 1989)
<i>Coefficient de partage matières en suspension – eau : log K<sub>p</sub></i>		5,23		(Stortedler <i>et al.</i> , 1989)
<i>Coefficient de partage sédiment – eau : log K<sub>p</sub></i>		5,5 (milieu marin) 5,05 (eau douce)		(Stortedler <i>et al.</i> , 1989)
<i>Constante de Henry (Pa.m<sup>3</sup>/mol)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	729,36 à 20°C	710 – 770 (20 – 25°C)	
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	3,6.10 <sup>-5</sup> à 20°C	(3,6 – 7,1).10 <sup>-5</sup> (20 – 25°C)	(Schroeder <i>et al.</i> , 1989)
	Organique CH <sub>3</sub> HgCl	6,6.10 <sup>-2</sup> à 25°C	(4,6 – 6,6).10 <sup>-2</sup> (25°C)	
<i>Coefficient de diffusion dans l'air (cm<sup>2</sup>/s)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	3,07.10 <sup>-2</sup>		
	Organique CH <sub>3</sub> HgCl	5,4.10 <sup>-2</sup>		(USEPA, 1996)
<i>Coefficient de diffusion dans l'eau (cm<sup>2</sup>/s)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	6,3.10 <sup>-6</sup>		(USEPA, 1996)
<i>Perméabilité cutanée à une solution aqueuse (cm/h)</i>	Élémentaire Hg <sup>0</sup>	1,2	0,8 – 1,5	
	Inorganique HgCl <sub>2</sub>	10 <sup>-3</sup>	9.10 <sup>-4</sup> – 3.10 <sup>-3</sup>	(USEPA, 1992)

Grâce aux données thermodynamiques des différentes espèces de mercure, on est en mesure de tracer le diagramme Eh – pH des espèces inorganiques (**Figure 2.2**). Sous certaines conditions bien choisies, le mercure élémentaire est stable en présence de H<sub>2</sub>S ou de SH<sup>-</sup>. Par contre, avec une diminution du potentiel redox, il y aura formation de HgS ou de HgS<sub>2</sub><sup>2-</sup> dépendamment du pH. Dans la partie oxydante du diagramme (350 – 400 mV), en fonction des conditions de pH et des concentrations en Cl<sup>-</sup>, ce sont des complexes inorganiques en Cl<sup>-</sup> et OH<sup>-</sup> qui vont se former.

Pour les concentrations indiquées dans le diagramme Eh – pH, l'espèce Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup>, qui est surtout présente dans les sols à cause des fongicides, n'est pas stable et a tendance à se dissocier pour donner du mercure élémentaire et du chlorure de mercure (Gilmour & Miller, 1973) selon l'**Équation 2.1** :



En conditions acides, le mercure est préférentiellement lié à la matière organique, alors qu'en conditions neutres ou légèrement alcalines, il peut également être lié aux minéraux (Andersson, 1979).

#### 2.2.4 Composées organiques de mercure dans l'environnement

Depuis le début des études sur le mercure, l'attention a surtout été portée sur la décomposition des espèces de mercure organique dans les sols. Quelques études (Kimura & Miller, 1964; Furukawa *et al.*, 1969) ont remarqué que le mercure avait tendance à redevenir du mercure élémentaire Hg<sup>0</sup>. Elles montrent également la dégradation des espèces organiques de mercure en mercure métallique et en hydrocarbures. Rogers (1976) a montré qu'il existait des preuves d'un mécanisme dans le sol qui empêche l'accumulation du méthylmercure, soit par déméthylation, soit par volatilisation. Ce procédé est influencé par l'humidité du sol, sa texture, le carbone disponible et la température. La méthylation, ainsi que la déméthylation, sont des transformations qui sont dues à des réactions microbiennes, mais qui peuvent également avoir lieu abiotiquement (Schuster, 1991).

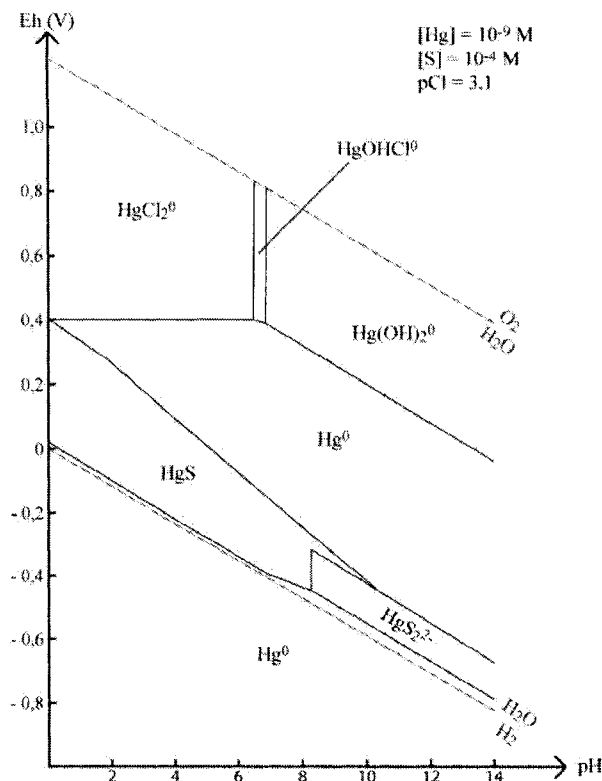


Figure 2.2 - Diagramme Eh-pH pour le mercure (Andersson, 1979)

Les espèces de mercure présentent donc des propriétés physico-chimiques différentes et se retrouvent dans divers compartiments de l'environnement selon les conditions in situ. Dans la prochaine sous partie, l'emphasis sera mise principalement sur la répartition du mercure dans les sols et sédiments, bien que les répartitions dans l'air, l'eau et le biote soient également présentées.

### 2.3 Répartition du mercure dans l'environnement

Tel que vu précédemment, à cause de sa grande volatilité, le mercure se retrouve en quantités non négligeables dans l'atmosphère. Il peut ensuite migrer vers d'autres environnements (eaux, sols...) et ainsi se retrouver dans tous les milieux. Le **Tableau 2.3** résume les concentrations moyennes de mercure que l'on retrouve dans différents compartiments : air, eaux (lacs, rivières, mers...), sols; mais également les concentrations moyennes que l'on retrouve dans certaines espèces animales et végétales.

**Tableau 2.3 - Concentrations du mercure dans l'environnement (Pichard, 2006)**

<b>Milieu</b>	<b>Concentration</b>
<i>Air</i>	1 à 4 ng/m <sup>3</sup> <sup>1</sup>
<i>Eau</i>	
Mercure total	
• Eaux souterraines	0,5 à 15 ng/L
• Lacs	0 à 12 ng/L
• Rivières	0,01 à 6 ng/L
• Mers	0,05 à 3 ng/L
Méthylmercure	
• Lacs	0,04 à 0,8 ng/L
• Eaux de pluies	< 0,5 à 0,6 ng/L
<i>Sols</i>	0,03 à 0,15 mg/kg (de sol sec) <sup>1</sup>
<i>Sédiments</i>	< 0,4 mg/kg (de sol sec) <sup>1</sup>
<i>Poissons</i>	
• D'eau douce	0,2 à 7 mg/kg (de poids frais) <sup>1</sup>
• De mer	0,01 à 1,5 mg/kg (de poids frais) <sup>1</sup>
• Thon – Espadon	0,3 à 7 mg/kg (de poids frais) <sup>1</sup>
<i>Coquillages et crustacés</i>	0,01 à 1 mg/kg (de poids frais) <sup>1</sup>
<i>Plantes</i>	< 0,1 mg/kg (de poids frais) <sup>1</sup>

Santé Canada (2008) a fixé la limite de concentration de mercure à 0,5 ppm pour les poissons commerciaux, mais certains comme le thon où le requin présentent des concentrations supérieures.

Cette partie va maintenant présenter succinctement les devenir du mercure dans l'air, l'eau et le biote avant de présenter la distribution et le devenir du mercure dans les sols.

### **2.3.1      *Mercure dans l'eau, le biote et l'air***

Dans des océans non pollués, la concentration en mercure total peut atteindre 0,5 à 3 ng/l et dans les eaux de pluie et les cours d'eau, elle peut atteindre 2 à 15 ng/l (Schroeder *et al.*, 1989). La majorité du mercure (75 %) présent dans l'eau provient de l'atmosphère

<sup>1</sup> Mercure total

sous forme de mercure élémentaire  $\text{Hg}^0$ , alors que le reste provient des eaux de surface par ruissellement (Gilmour & Henry, 1991). Lorsqu'il entre dans le compartiment eau, le mercure est donc principalement sous forme élémentaire et est donc très peu soluble. Cependant, son oxydation en  $\text{Hg}^{2+}$  en conditions aérobies lui permet de subir plusieurs processus, comme la méthylation par les microorganismes, ou la déposition en sulfure de mercure. Ainsi, il peut se retrouver piéger dans les sédiments sous forme de sulfure de mercure ( $\text{HgS}$ ). Toutes les réactions qui ont lieu dans l'eau dépendent du pH, du Eh et de la teneur en carbone organique dissous (COD). La teneur en COD détermine la tendance qu'a le mercure à se méthyler, ce qui influe donc sur sa mobilité et sur sa biodisponibilité (Stein *et al.*, 1996).

L'ingestion de poissons ou de légumes contenant du méthylmercure est la voie d'exposition la plus importante en ce qui concerne l'absorption de mercure chez l'homme (Carpi *et al.*, 1994). Ces expositions peuvent avoir comme conséquences des dommages au niveau du système nerveux, des reins et des poumons (USDHHS, 1999). Les formes neutres de mercure, organique ou inorganiques sont parmi les plus dangereuses, car elle diffuse passivement à travers les parois de l'organisme. Elles peuvent avoir tendance à s'accumuler dans les graisses et les muscles des organismes. Dans les tissus, elles peuvent être oxydée en  $\text{Hg}^{2+}$  et ainsi être responsable d'effets toxiques.

Le temps de vie du mercure dans l'atmosphère est estimé entre 30 et 100 jours (en moyenne de 60 jours) (Goldman & Shannon, 2001; Counter & Buchanan, 2004). Dans ce compartiment, cinq formes de mercure prédominent dans les proportions suivantes :  $\text{Hg}^0$  pour 53 %,  $\text{Hg(II)}$  pour 37 % et 10 % de mercure particulaire (Pacyna *et al.*, 2006). La transformation principale du mercure dans l'air est l'oxydation par l'ozone atmosphérique du mercure élémentaire  $\text{Hg}^0$  en mercure divalent  $\text{Hg}^{2+}$ . Ceci confère donc au mercure la possibilité de participer à des réactions subséquentes, comme la complexation, ce qui aurait comme effet d'augmenter sa solubilité et donc sa mobilité et sa biodisponibilité. Le mercure peut également se déposer dans l'eau, le sol ou les

sédiments, de manière sèche ou humide. À partir de ces mêmes environnements, il peut également se volatiliser pour se retrouver à nouveau dans l'atmosphère.

### 2.3.2 *Mercure dans les sols et les sédiments*

Les sols et les sédiments peuvent affecter la distribution du mercure de deux manières. Tout d'abord, ils peuvent agir comme des sources de mercure, lorsque celui-ci se volatilise à partir des sols ou des sédiments vers l'atmosphère, ou migre des sols vers l'eau, ou encore est ingéré par le biote. Dans l'autre sens, les sols et les sédiments peuvent également agir comme un réservoir pour le mercure provenant par exemple de la déposition à partir de l'atmosphère, ou le dépôt de particules en suspension contenant du mercure dans les sédiments.

Certains microorganismes des sols sont capables de réduire le mercure inorganique en mercure élémentaire, ce qui peut entraîner sa volatilisation. La lixiviation du mercure inorganique est insignifiante par rapport à l'évaporation qui semble s'accroître dans les sols où la teneur en mercure augmente (Selin *et al.*, 2008). Cependant, ces processus sont modérés par les activités microbiennes et non microbiennes. Le mercure élémentaire gazeux peut être transféré des sols à fort taux de vaporisation vers ceux à faible taux de vaporisation, phénomène qui est influencé par la teneur en mercure, les teneurs en matière organique et en argile, les activités microbiologiques et biochimiques et l'aération du sol. Ainsi, la volatilisation du mercure a tendance à diminuer les concentrations dans les sols pollués (Andersson, 1979; Stein *et al.*, 1996).

Les composés organiques de mercure dans les sols sont décomposés par brisures des liaisons mercure – carbone, cette dégradation produisant du mercure métallique et des hydrocarbures (Furukawa *et al.*, 1969). Rogers (1976) a montré qu'il existait des mécanismes dans le sol qui préviennent l'accumulation de mercure, soit par déméthylation, soit par volatilisation. Ces procédés sont influencés par la teneur en eau dans le sol ainsi que par sa texture, sa température et sa teneur en carbone disponible. Les réactions microbiennes et biochimiques ne sont pas seulement capables de briser les

liaisons entre le mercure et le carbone, mais elles peuvent également générer leur formation. Certaines bactéries, comme celles faisant parti du genre *Clostridium*, ou les bactéries sulfato-réductrices, sont capables de former du méthylmercure à partir d'autres composés de mercure, mais pas à partir de sulfure de mercure (Yamada & Tonomura, 1972; Schuster, 1991; Boudou *et al.*, 2006). Cette réaction ne dépend pas du pH mais présente un optimum pour un pH voisin de 7. Contrairement au méthylmercure qui est fortement adsorbé, le diméthylmercure a une forte tendance à se volatiliser. Le méthylmercure est plus influencé par la lixiviation que le mercure inorganique, mais leur fraction évaporée est approximativement la même. L'adsorption du mercure augmente avec la diminution de la taille des particules et avec l'augmentation de la surface spécifique. L'adsorption dépend également du pH, avec un maximum aux alentours de pH 7 (Andersson, 1979). Le mercure dans la solution de sol a tendance à s'adsorber sur les sites abondants dans les fractions fines des sols, et éventuellement à entrer dans la formation de nouvelles structures cristallines des minéraux argileux et des sesquioxydes (oxydes contenant un atome et demi d'oxygène pour un atome de l'autre élément). Cependant ces dernières possibilités sont limitées car le rayon atomique de mercure divalent est trop grand pour de nombreuses positions. Cet ion pourrait cependant remplacer l'ion  $K^+$  que l'on retrouve dans certaines structures comme l'illite. Il peut également y avoir la formation de nouveaux précipités de mercure aux mêmes endroits sur les surfaces des minéraux. On retrouvera donc dans les minéraux argileux dont la surface spécifique est grande, les deux types d'adsorption (Stein *et al.*, 1996).

On trouve les plus faibles concentrations de mercure dans la fraction sable (7,1 – 20 ng/g), les plus fortes dans l'argile (48 – 370 ng/g) et des concentrations intermédiaires dans le silt. Ceci indique donc que les concentrations de mercure augmentent avec la surface spécifique et également avec le degré d'altération du matériel original. Dans les sols, ce sont principalement les minéraux argileux, les sesquioxydes et le matériel organique (matières humiques) qui sont responsables de la rétention des métaux. Cependant, leur importance respective varie selon l'horizon de sol considéré ainsi que le type de sol. Forbes et al. (1974) ont montré que dans le cas du



mercure la rétention se fait non seulement par échange cationique, mais également par des liaisons plus solides d'adsorption chimique (avec des ligands OH<sup>-</sup>), notamment avec les sesquioxides ainsi qu'avec des composants humiques.

Andersson (1979) présente des résultats d'adsorption de mercure inorganique dans des solutions contenant différents types de sols et constate que pour des sols acides (pH < 4,5 – 5), le seul adsorbant efficace est la matière organique, alors que pour des sols de pH neutre, les oxydes de fer (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et les minéraux argileux deviennent nettement plus efficaces. Sous des conditions neutres, la séquence des minéraux capables de retenir le mercure est la suivante : Al(OH)<sub>3</sub> < kaolinite < montmorillonite < sol illitico-argileux < sol latéritique < Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ainsi, sous des conditions acides, c'est la matière organique qui régule l'adsorption de mercure, alors que sous des conditions neutres, c'est plutôt les minéraux argileux et les oxydes de fer. C'est pourquoi dans les horizons pauvres en matière organique, la mobilité du mercure va augmenter avec une diminution de pH (Stein *et al.*, 1996). Cependant, le rôle de la matière organique dans la rétention du mercure semble être double. En effet, tant que les conditions physico-chimiques permettent à la matière organique de rester dans un état de floculation et de précipitation, les complexes de mercure seront retenus dans le sol. Si les conditions changent, par exemple à cause d'une lixiviation, les complexes organiques, y compris les complexes de mercure, sont susceptibles de passer en solution et de re-précipiter dans des horizons plus profonds si les conditions le permettent (Andersson, 1979).

Dans la plupart des sols actuels, la concentration de mercure n'est pas encore problématique et le taux auquel elle augmente n'indique pas que des problèmes sérieux vont survenir avant 100 ans (Andersson, 1979). Cela prendra plus d'un siècle pour que la concentration actuelle double. Cependant, il est inquiétant de voir que des composés comme l'alkylmercure, très dangereux et très toxique, sont régulièrement ajoutés aux engrais et donc aux sols agricoles. Bien que ces composés ne s'accumulent pas dans les sols, ils sont néanmoins susceptibles de se bioaccumuler dans les chaînes alimentaires (Stein *et al.*, 1996).



## 2.4 Biodisponibilité, bioaccessibilité et analyse de risque

Pourquoi prendre en compte la biodisponibilité des métaux dans les évaluations de risque ? Dans les études de toxicologie ou d'évaluation des risques, il est important de considérer la biodisponibilité des métaux lourds, tels que le mercure, dans les sols. En effet, elle représente comment et combien un métal est disponible pour affecter l'organisme récepteur. La biodisponibilité du mercure peut être influencée par divers paramètres physico-chimiques (par exemple la spéciation, les propriétés des sols) mais également par des facteurs biologiques (les mécanismes d'absorption intestinale, les fluides gastro-intestinaux...). Par ailleurs, connaître la biodisponibilité d'un métal sur un site peut permettre de diminuer les coûts de restauration (Kelley *et al.*, 2002).

### 2.4.1 *Définitions et concepts de biodisponibilité et de bioaccessibilité*

La biodisponibilité représente à quel point un produit chimique ou un métal peut être absorbé par un organisme vivant (Kelley *et al.*, 2002). Lorsque l'on parle d'évaluation des risques pour les sols contaminés, cette définition inclut obligatoirement le fait que la substance doive se dissocier, se dissoudre ou se desorber du sol pour devenir disponible pour l'absorption par les organismes.

Il existe deux types de biodisponibilité, la biodisponibilité absolue (BDA) et la biodisponibilité relative (BDR). La BDA représente la fraction, ou le pourcentage, d'un composant qui a été ingéré, inhalé ou appliqué sur la peau et qui est effectivement passé dans l'organisme et a atteint la circulation systémique (Hrudey *et al.*, 1996). On peut donc définir la biodisponibilité absolue par la formule suivante :

$$\text{BDA (\%)} = \frac{\text{dose absorbée}}{\text{dose administrée}} \times 100 \quad \text{Équation 2.2}$$

La dose absorbée est souvent mesurée par la concentration que l'on retrouve dans la circulation sanguine en fonction du temps, ou alors dans les excréments, l'urine, ou l'air expiré. Cependant, étant donné qu'elle est souvent difficile à obtenir, on utilise plus

souvent, en toxicologie, les doses administrées pour quantifier les risques, et donc le calcul de la biodisponibilité absolue n'est généralement pas utilisé.

La biodisponibilité relative (BDR) représente une mesure de la différence dans l'ampleur de l'absorption de deux formes du même élément ou plus. Elle peut également quantifier la mesure de la différence dans l'ampleur de l'absorption parmi deux voies de contamination ou plus. Dans les études toxicologiques, la détermination de la biodisponibilité relative est essentielle, car elle permet de prendre en compte les effets de la matrice du sol sur la mobilité et donc la disponibilité du contaminant (Frankenberger, 2002). Ces effets peuvent diminuer significativement la biodisponibilité d'un métal qui sera lié au sol par rapport à sa forme originale utilisée dans les mesures de dose de référence (RfD) ou de *Cancer Slope Factor* (CSF, facteur cancérigène moyen). Dans l'évaluation des risques environnementaux, on considère que la biodisponibilité relative est calculée par le ratio entre la fraction absorbée du contaminant à partir du sol et la fraction absorbée du contaminant à partir d'un environnement standard utilisé dans les études toxicologiques (Kelley *et al.*, 2002).

$$\text{BDR (\%)} = \frac{\text{fraction absorbée du sol}}{\text{fraction absorbée de l'environnement standard}} \times 100 \quad \text{Équation 2.3}$$

L'utilisation de cette formule peut se faire lorsque l'on connaît la biodisponibilité absolue du contaminant dans le milieu considéré, ainsi que dans l'environnement standard. Cependant, comme dans la plupart des études on ne connaît pas ces valeurs, on doit faire appel à des mesures expérimentales à partir d'études sur des animaux (*in vivo*) ou en laboratoire (*in vitro*).

Enfin, on peut définir un troisième indice, la bioaccessibilité d'un contaminant. Celle-ci est définie comme la fraction solubilisée d'un élément à partir d'un échantillon de sol qui a été soumis à des conditions gastro-intestinales par une méthode *in vitro* (Schoof, 2004). La bioaccessibilité est utilisée pour déterminer la biodisponibilité relative et ainsi obtenir des estimations de la biodisponibilité orale. Ces trois indices sont fortement affectés par les propriétés des sols et des contaminants et dépendent donc de la

spéciation du contaminant considéré (USEPA, 2007). Dans une prochaine partie seront développés quelques mécanismes qui influencent ces indices, (adsorption, réaction chimiques) ainsi que des propriétés des sols (granulométrie, teneur en matière organique...) qui les influencent.

#### 2.4.2 *Évaluation des risques pour la santé humaine*

La détermination de la biodisponibilité relative d'un contaminant sert principalement à déterminer d'autres facteurs qui entrent en jeu dans l'évaluation des risques pour la santé humaine. Les enfants qui portent fréquemment leurs mains à leur bouche, sont susceptibles d'absorber des métaux lourds à partir des sols par ingestion (Counter & Buchanan, 2004; Ljung *et al.*, 2006). L'ingestion de sols contaminés au mercure peut être une voie d'exposition majeure pour les jeunes enfants (Nusslein *et al.*, 1995), suivie par l'inhalation de particules de sols contaminés ou l'absorption dermique. La première étape dans l'analyse de risque est d'évaluer la quantité de métal qui a été ingérée par l'individu. Pour ce faire, on utilise le *Chemical Daily Intake* (CDI, dose journalière ingérée de contaminants) qui est défini par la formule suivante (**Équation 2.2**) et qui permet de quantifier l'exposition à un métal considéré (Schoof, 2004). Une fois que l'on a déterminé la biodisponibilité relative, on peut évaluer le CDI et effectuer l'analyse de risque pour la santé humaine. Le CDI représente la dose quotidienne ingérée de contaminant que l'on peut rapporter à une durée de vie (généralement prise égale à 70 ans) si l'on s'intéresse aux conséquences sur le long terme, comme les effets cancérogènes par exemple.

$$CDI = \frac{(CS)(IR)(CF)(RAF)(EF)(ED)}{(BW)(AT)} \quad \text{Équation 2.4}$$

- où
- CDI est la dose quotidienne ingérée de contaminant ( $\text{mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ),
  - CS est la concentration de l'élément dans le sol ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ),
  - IR est le taux d'ingestion ( $\text{mg de sol.jour}^{-1}$ ),
  - CF est un facteur de conversion (valant  $10^{-6} \text{ kg.mg}^{-1}$ ),
  - RAF est un facteur d'absorption relative (sans unité) égal à la bioaccessibilité,

EF est la fréquence d'exposition (jour.année<sup>-1</sup>),

ED est la durée d'exposition (année),

BW est la masse de l'organisme récepteur (kg),

AT est une durée moyenne d'exposition (typiquement choisie à 70 ans).

Il est nécessaire de bien faire la distinction entre le risque et le danger. Le risque est la probabilité de dommage et peut être considéré comme étant le produit de la probabilité que l'événement survienne par les conséquences qu'il pourrait entraîner. En écotoxicologie, le risque peut être défini par la probabilité qu'un organisme subisse des dommages suite à l'exposition à un danger environnemental. Le risque total peut être décomposé comme la somme du risque de fond, auquel tout le monde est sujet, plus du risque occasionnel causé par exemple par des sols contaminés qui engendrent un danger. Le danger est différent du risque en ce sens que c'est un terme qui décrit et caractérise la possibilité qu'un événement cause du tort à quelqu'un ou quelque chose. On peut donc dire que le danger est une source de risque. Ainsi, le risque pour l'homme peut être évalué par le produit du CDI par le CSF, qui est une valeur toxicologique de référence utilisée pour déterminer les effets cancérogènes (Schoof, 2004).

$$\text{Risque} = \text{CDI} \times \text{CSF}$$

**Équation 2.5**

Dans l'équation précédente, le risque représente une probabilité, donc est sans unité, le CDI représente la dose de contaminant absorbée par jour, en mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>, et le CSF est la valeur de référence et est donc en (mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>. Les valeurs toxicologiques de références des différentes espèces de mercure peuvent être trouvées sur des sites Internet comme celui de l'USEPA (USEPA, 1995). Le risque évalué précédemment est utilisé pour des effets cancérogènes. C'est pour cela que l'on utilise le CSF. Les effets non cancérogènes sont plutôt évalués par une approche probabiliste. Dans ce cas, on compare la dose absorbée de contaminant avec une dose de référence, RfD. On a donc la formule suivante pour le *Hazard Index* (HI) pour les effets non cancérogènes.

$$HI = \frac{CDI}{RfD}$$

**Équation 2.6**

Cependant, les valeurs de références des tables de IRIS du site d'USEPA sont déterminées pour des conditions particulières. C'est pourquoi par rapport aux mesures in vitro, il est nécessaire d'effectuer des corrections afin d'obtenir les bonnes probabilités de risque. La biodisponibilité relative (BDR) permet de corriger les indices du CDI, du CSF et de la RfD.

$$CDI_{ajusté} = CDI \times BDR$$

**Équation 2.7**

$$CSF_{ajusté} = CSF_{IRIS} \times BDR$$

**Équation 2.8**

$$RfD_{ajustée} = \frac{RfD_{IRIS}}{BDR}$$

**Équation 2.9**

Ainsi, on peut exprimer les probabilités de risque et de HI en fonction de la valeur de biodisponibilité que l'on mesure, de la valeur de CDI que l'on estime et des valeurs de référence que l'on trouve sur le site IRIS.

### **2.4.3 Toxicité du mercure et doses de référence**

Comme vu précédemment, le mercure est capable de s'accumuler dans les organismes. Le méthylmercure est la forme qui se bio-accumule dans les fourrures des animaux, les cheveux des humains, et de nombreux organes comme le cerveau, le foie... Il s'agit de la forme la plus toxique de mercure qui est le plus souvent absorbée par ingestion de produits contenant du mercure (poissons, fruits de mer). Le mercure élémentaire volatil est la deuxième espèce la plus dangereuse. Elle est susceptible de passer dans l'organisme par inhalation (Pichard, 2006).

C'est en bout de chaîne trophique, là où les concentrations sont les plus élevées, que les effets toxiques du mercure sont les plus importants (Thomassin & Touze, 2003). Les vertébrés, et particulièrement leur système nerveux, sont très sensibles au méthylmercure qui est un puissant neurotoxique. Le méthylmercure est capable d'atteindre de nombreux organes cibles en passant à travers les parois de l'organisme. De plus, la mère peut le transmettre au fœtus. Le mercure dans l'organisme humain commence par dérégler les organes de synthèse des protéines. D'autres effets peuvent ensuite survenir comme des dysfonctionnements au niveau des reins, des lésions des centres nerveux. Finalement l'absorption de mercure ou de produits mercuriels peut

entraîner des troubles mentaux plus ou moins graves, des douleurs abdominales, des vomissements... Que ce soit une exposition à court ou long terme, les effets sont les mêmes. Mais plus l'exposition est importante, plus les effets seront graves et irréversibles (Thomassin & Touze, 2003). Les **Tableaux 2.4** et **2.5** présentent les valeurs normales des concentrations de mercure que l'on trouve chez l'homme, ainsi que les doses de références définies par des organismes tels l'USEPA, l'OMS, ou l'ATSDR, qui indiquent à partir de quelle concentration des effets sur la santé apparaissent.

**Tableau 2.4 - Valeurs normales de référence du Hg total chez l'homme (WHO-IPCS, 1976)**

<i>Site Cible</i>	Concentration	
	Valeur	Unité
<i>Sang</i>	5 – 10	µg/L
<i>Urine</i>	4	µg/L
<i>Cheveux</i>	1 – 2	mg/kg
<i>Placenta</i>	10	mg/kg

**Tableau 2.5 : Valeurs toxicologiques de référence (Pichard, 2006)**

Composé	Source	Voie d'exposition	Facteur d'incertitude	Valeur de référence
Hg <sup>0</sup>	(USEPA, 1997)	Inhalation	30	RfC = 3.10 <sup>-4</sup> mg/m <sup>3</sup>
	(ATSDR, 2001)	Inhalation	30	MRL = 2.10 <sup>-4</sup> mg/m <sup>3</sup>
HgCl <sub>2</sub>	(USEPA, 1997)	Orale	1000	RfD = 3.10 <sup>-4</sup> mg/kg/j
	(ATSDR, 2001)	Orale	100	MRL = 7.10 <sup>-3</sup> mg/kg/j (a.)
	(ATSDR, 2001)	Orale	100	MRL = 2.10 <sup>-3</sup> mg/kg/j (c.)
MeHg	(USEPA, 2001)	Orale	10	RfD = 10 <sup>-4</sup> mg/kg/j
	(ATSDR, 2001)	Orale	4,5	MRL = 3.10 <sup>-4</sup> mg/kg/j
	(OMS, 2004)	Orale	ND	DHPT = 1,6.10 <sup>-3</sup> mg/kg/j
APHg	(USEPA, 1997)	Orale	100	RfD = 8.10 <sup>-5</sup> mg/kg/j
Hg <sub>tot</sub>	(OMS, 2004)	Orale	ND	DHPT = 5 µg/kg
Hg	(OMS, 2000)	Inhalation	20	Valeur guide = 1 µg/m <sup>3</sup>

MeHg : méthylmercure – APHg : acétate de phénylmercure – a. aiguë – c. chronique –

RfC : Reference Concentration – RfD : Reference Dose – MRL : Minimal Risk Level –

DHPT : Dose Hebdomadaire Provisoire Tolérable



#### ***2.4.4 Risques pour des enfants exposés à des sols contaminés au mercure***

Toutes les formes de mercure sont toxiques pour les humains et donc pour les enfants en particulier, que ce soit le mercure élémentaire, organique ou inorganique (Goldman & Shannon, 2001). Cependant, chaque forme de mercure présente un comportement particulier ainsi qu'une toxicité différente.

##### ***2.4.4.1 Sources d'exposition***

Le mercure élémentaire pénètre à l'intérieur de l'organisme des être humains principalement par inhalation. Les sources les plus fréquentes sont les amalgames dentaires, les objets contenant du mercure élémentaire, comme les thermomètres et les baromètres, ou la combustion des amalgames de mercure avec des métaux, particulièrement en Amazonie où les amalgames avec l'or sont brûlés pour extraire le précieux métal. La concentration de référence définie par l'USEPA pour l'inhalation de mercure élémentaire est de  $3.10^{-4}$  mg/m<sup>3</sup> (USEPA, 1997).

La forme de mercure organique la plus dangereuse est le méthylmercure que l'on retrouve principalement dans les poissons consommés régulièrement, comme le thon ou le saumon. Les autres espèces de mercure organique, comme l'éthylmercure, sont tout aussi dangereuses, mais moins présentes (Counter & Buchanan, 2004). Le méthylmercure dans les graisses des animaux provient de la méthylation du mercure élémentaire ou inorganique présent dans l'eau. Ensuite il se bio-accumule dans les tissus. L'USEPA a fixé la dose de référence du MeHg par ingestion à  $10^{-4}$  mg/kg/j (USEPA, 2001). La source principale d'ingestion de méthylmercure est la consommation de poissons contaminés (> 99 %), tandis que l'ingestion de sols contaminés représente une source négligeable (< 0.001 %) (USEPA, 2001). Cependant, l'ingestion totale de méthylmercure est estimée à  $1.7.10^{-3}$  mg/kg/jour pour les enfants de 0 à 14 ans, ce qui dépasse le critère établi par l'USEPA (USEPA, 2001).

Certaines formes de mercure inorganique ont été utilisées dans des produits de beauté ou des dentifrices et il a été démontré que certains de ces produits pouvaient entraîner des concentrations en mercure dans les urines supérieures à celles de référence (Weldon *et al.*, 2000). La dose de référence pour l'ingestion de chlorure de mercure a été fixée par l'USEPA à  $3.10^{-4}$  mg/kg/jour (USEPA, 1997). Le mercure inorganique, notamment dans sa forme divalente, peut être en concentration plus importante dans les sols et c'est pourquoi on va s'intéresser par la suite à l'exposition des enfants face à l'ingestion de sols contaminés.

#### 2.4.4.2 Ingestion de sol contaminé

L'ingestion de sols contaminés par les jeunes enfants, lorsqu'ils jouent en extérieur et portent leurs mains à leur bouche, est considérée comme une voie d'exposition majeure aux principaux composés chimiques toxiques (Revis *et al.*, 1990; Paustenbach *et al.*, 1997; Pouschat & Zagury, 2006). Barnett et Turner (2001) estime même qu'il s'agit de la voie d'exposition la plus importante lorsque l'on s'intéresse au mercure. Pour les jeunes enfants de 1 à 7 ans, la masse quotidienne de sol ingéré a été évaluée à 100 mg/jour (USEPA, 2006). Dans le cas d'enfants présentant un comportement de type « pica », cette masse peut monter jusqu'à 10 g/jours. Une étude (Nusslein *et al.*, 1995) a étudié les différentes contributions des expositions au mercure pour une population donnée vivant à proximité d'un site contaminé. Les jeunes enfants (1 – 4 ans) étaient les plus exposés comparativement à leur masse corporelle, et en considérant une ingestion de 240 mg/jour de sol contaminé, celle-ci devenait la voie d'exposition principale.

L'ingestion de sols contaminés peut donc être une voie d'exposition majeure pour les jeunes enfants. Si ceux-ci ingèrent de quelques dizaines de milligrammes jusqu'à quelques grammes par jour, la dose absorbée peut dépasser la dose de référence. Cependant comme on l'a vu précédemment, le risque et le danger dépendent fortement de la bioaccessibilité du mercure dans les sols. Cette bioaccessibilité elle-même dépend de la fraction de mercure qui va être solubilisée dans le système gastro-intestinal des enfants. Or les espèces de mercure présentent des solubilités très variables, de 73.1 g/l

pour  $\text{HgCl}_2$  à  $3.5 \cdot 10^{-25}$  g/l pour  $\text{HgS}$  (Benoit *et al.*, 1999). Il est donc primordial d'avoir recours à des techniques in-vitro afin d'évaluer la bioaccessibilité.

## 2.5 Méthodes de mesure de biodisponibilité et de bioaccessibilité

Afin d'estimer la biodisponibilité d'un métal, on peut procéder en effectuant des mesures in vivo (sur des animaux) ou en déterminant la bioaccessibilité grâce à des méthodes in vitro (dans des réacteurs en laboratoire). Cependant les procédures in vitro présentent plusieurs avantages par rapport à celles in vivo, notamment d'être moins dispendieuses et plus simples à mettre en place. La détermination de la bioaccessibilité du mercure est donc une bonne alternative à la détermination de la biodisponibilité in vivo (Schoof & Nielsen, 1997). En effet, la bioaccessibilité mesure la fraction de mercure qui sera solubilisée dans le système gastro-intestinal, alors que la biodisponibilité mesure la fraction de mercure qui a réellement traversé la paroi et atteint la circulation systémique. La bioaccessibilité fournit donc une valeur conservatrice de la biodisponibilité. Les études in vivo et in vitro déjà réalisées pour le mercure sont présentées par la suite.

### 2.5.1 *Études in vivo pour déterminer la biodisponibilité du mercure*

Seules deux études in vivo ont été réalisées pour le mercure contenu dans des sols, comparativement à de nombreuses qui ont été réalisées pour d'autres métaux comme l'arsenic, le cuivre ou le plomb (Paustenbach *et al.*, 1997). Dans ces deux études, le protocole consistait à mélanger des sols contaminés au mercure avec de l'alimentation pour les souris. Pour ce qui est de la première étude (Revis *et al.*, 1990), on a mélangé du sol (contenant près de 90 % de sulfure de mercure) et des aliments en proportion massique 1/20, que l'on a ensuite donné comme nourriture à des souris pendant 24 heures. Le taux d'absorption du mercure a été mesuré entre 4 et 16 % de la dose ingérée. Cependant, il faut noter que ces valeurs ont été calculées à partir du mercure récupéré dans les excréments, sans tenir compte du mercure initialement absorbé, puis rejeté par l'organisme. De plus, lors de cette même étude, on a utilisé des échantillons

spikés avec du  $\text{HgCl}_2$  et du  $\text{HgS}$ , et on a obtenu des absorptions respectives de 2.1 % et 0.4 %. La seconde étude (Sheppard *et al.*, 1995) n'apporte pas beaucoup d'information, si ce n'est que l'ajout de 20 % de sol à la nourriture des souris diminue par un facteur de 2,3 l'absorption du mercure. Ainsi, les méthodes *in vivo* ne permettent pas de déterminer de manière précise la biodisponibilité orale du mercure. Par ailleurs, ces deux études *in vivo* utilisaient des souris comme modèle animal pour représenter le système gastro-intestinal d'un enfant, alors qu'il serait plus judicieux d'utiliser des singes ou des porcelets, dont le système digestif se rapproche plus de celui des enfants (Kelley *et al.*, 2002).

### 2.5.2 *Études in vitro pour déterminer la bioaccessibilité du mercure*

Peu d'études ont été réalisées sur la détermination *in vitro* de la bioaccessibilité du mercure dans les sols. Sheppard *et al.* (1995) ont quantifié l'extraction du mercure à partir de sols contaminés en les digérant pendant 24 heures dans 50 ml d'eau distillée ajustée à un pH de 2 à l'aide d'acide chlorhydrique. Les proportions de mercure extrait variaient entre 0 et 60 %, et étaient fortement influencées par la capacité d'échange cationique (CEC) des sols. En effet, les sols ayant la plus faible CEC (0 – 80 cmol/kg) présentaient les taux d'extraction les plus importants. Deux autres études (Camp Dresser and Mc Kee Inc., 1992; Barnett *et al.*, 1997) ont mesuré la bioaccessibilité du mercure à partir de sols contaminés par des industries : une usine de production du lithium utilisant du mercure métallique dans le premier cas (*East Fork Poplar Creek, Oak Ridge, TN*) ; et le parc d'Almaden (*Almaden Quicksilver County Park*) dans le second cas, exploité pour le cinabre (sulfure de mercure). Le protocole expérimental (méthode CDM) développé dans le cadre de la première étude a également servi dans le cadre de la seconde. Il s'agit de digérer une certaine masse de sol dans un volume d'eau déionisée et désaérée. L'extraction se déroule en deux phases, une phase gastrique caractérisée par un pH de 2,5 et une phase intestinale caractérisée par un pH de 6,5. Au cours de chacune des phases de 4 heures, réalisée à température ambiante, le pH est régulièrement vérifié et une agitation est maintenue à 30 rpm. À la fin de chacune des phases, une fraction de la

solution est prélevée, filtrée et analysée pour le mercure total. Cette méthode a été testée sur des sols naturels prélevés à proximité des sites industriels mentionnés précédemment, des résidus calcinés, des poussières de four, et sur des composés purs ( $\text{HgCl}_2$  et  $\text{HgS}$ ). Les résultats de bioaccessibilité sont présentés dans le **Tableau 2.6**.

**Tableau 2.6 - Mesures de bioaccessibilité par la méthode CDM pour les deux études**

Étude	Échantillon	Composition	Bioaccessibilité gastrique (%)	Bioaccessibilité intestinale (%)
(Camp Dresser and Mc Kee Inc., 1992)	Résidus calcinés	$\text{HgS}$ (89 %), $\text{HgS} + \text{O}$ (9 %) et $\text{HgSO}_4$ (2 %)	1.2	5.8
	Poussières de four	$\text{HgS}$ (89 %) et Oxyde de Hg (10 %)	10.8	8.0
	Cinabre	$\text{HgS}$ (>98 %)	0.02	0.05
	Chlorure de mercure	$\text{HgCl}_2$	60.5	52.5
(Barnett & Turner, 2001)	Chlorure de mercure	$\text{HgCl}_2$	98	82
	Sulfure de mercure	$\text{HgS}$	< 0.001	< 0.001
	Sol (minimum)	-	0.1	0.2
	Sol (maximum)	-	29	17
	Sol (moyenne)	-	3.5	1.8

On constate que les résultats pour le chlorure de mercure et pour le sulfure de mercure ne sont pas identiques pour les deux études. Ceci pourrait éventuellement être expliqué par les méthodes d'analyses. Il reste que le chlorure de mercure présente la bioaccessibilité maximale par rapport à tous les autres échantillons testés. On remarque également que le sulfure de mercure est très peu bioaccessible, ce qui est dû à sa faible solubilité. La bioaccessibilité d'un échantillon est donc inversement proportionnelle à sa teneur en  $\text{HgS}$ . C'est pourquoi les bioaccessibilités des échantillons composés principalement de sulfure de mercure sont quasiment nulles. En ce qui concerne les sols, on constate que la bioaccessibilité est très variable dépendamment des échantillons, et que la moyenne est faible (environ 3,5 %). Ces deux études ont donc montré qu'il était important de connaître la spéciation du mercure dans un échantillon, afin de pouvoir la comparer avec la bioaccessibilité.

### 2.5.3 *Besoins des études de biodisponibilité*

Dans les études de cas de sites contaminés, il a été conseillé d'évaluer la bioaccessibilité des contaminants à partir de méthodes *in vitro*, mais également de valider ces résultats par des méthodes de biodisponibilité *in vivo* (Paustenbach *et al.*, 1997; Schoof & Nielsen, 1997; Zagury, 2007). De plus, il est important de considérer que la biodisponibilité du mercure est principalement contrôlée par la biodisponibilité intestinale, car l'absorption des contaminants se déroule principalement dans l'intestin (Rodriguez *et al.*, 1999). Par ailleurs, les méthodes *in vitro* devraient être plus représentatives de la réalité que la méthode CDM, en incorporant, par exemple, des fluides gastro-intestinaux, un ratio solide/liquide plus réaliste et éventuellement une substance organique pouvant adsorber le mercure (Davis *et al.*, 1997). Enfin, comme souligné précédemment, il serait également judicieux de déterminer la spéciation du mercure dans le sol étudié en plus des tests de bioaccessibilité.

### 2.5.4 *Description et comparaison des protocoles in vitro*

Afin de déterminer la bioaccessibilité des métaux, plusieurs méthodes *in vitro* ont été mises en place pour simuler, grâce à des variations de pH et à des fluides gastro-intestinaux, le passage du sol contaminé dans l'organisme humain, que ce soit au niveau de l'estomac ou au niveau de l'intestin. Trois protocoles expérimentaux (CDM, IVG et SBRC) sont comparés, mais les descriptions précises sont présentées en **Annexe 1**. Plusieurs points communs se retrouvent dans chacune de ces méthodes. Tout d'abord, les analyses sont réalisées sur la fraction de sol < 250 µm. En effet, c'est la fraction qui est reconnue pour adhérer d'elle-même aux doigts des enfants et qui est donc susceptible d'être ingérée (Duggan & Inskip, 1985). Les conditions anaérobies sont recrées au cours des deux phases gastriques et intestinales, soit en utilisant des contenants fermés et des solutions désaérées, soit en diffusant de l'argon. De plus, une agitation est maintenue tout au long de l'expérience pour simuler le mélange dans l'organisme. Cependant, ces trois méthodes présentent quelques différences, notamment la solution gastrique d'origine qui ne contient pas les mêmes composants, ni les mêmes concentrations. Par

exemple, la méthode CDM, la plus simple, n'emploie aucun adjuvant à la solution d'origine qui est simplement de l'eau déionisée et désaérée ajustée au pH voulu. Le pH pour chacune des phases, n'est pas le même suivant les méthodes, de même que les durées des phases. Ces deux paramètres déterminent si les conditions gastro-intestinales sont bien représentées (Oomen *et al.*, 2002). De plus, le ratio solide:liquide utilisé n'est pas non plus identique. Par exemple, dans les trois méthodes CDM, IVG et SBRC, on analyse respectivement 0,37 g pour un demi-litre de solution, 1 g pour 150 ml de solution et 1 g pour 100 ml de solution, ce qui représente une très grande variabilité. Le **Tableau 2-7** reprend toutes les informations concernant les trois méthodes de mesure de la bioaccessibilité et permet de bien distinguer les différences.

**Tableau 2.7 - Principales caractéristiques des trois méthodes in vitro CDM, IVG et SBRC**

	Méthode	CDM	IVG	SBRC
<b>Paramètres initiaux</b>	Température (°C)	22	37	37
	Rotation (rpm)	30	100	30
	Conditions anaérobies	oui	oui	oui
<b>Solution initiale</b>	Volume d'eau déionisée (ml)	500	750	2000
	Masse de NaCl (g)	-	6,57	-
	Masse de glycine (g)	-	-	60,06
	Masse de pepsine (g)	-	7,5	-
	Volume utilisé (mL) par échantillon	500	150	100
<b>Sol étudié</b>	Masse utilisée (g)	0,37	1	1
	Granulométrie	< 250 µm	< 250 µm	< 250 µm
<b>Phase gastrique</b>	Durée (h)	4	1	1
	pH	2,5 ± 0,05	1,8 ± 0,05	1,5 ± 0,05
	Temps de repos (min)	25	0	0
	Volume prélevé (mL)	50	15	5
	Filtre utilisé	0,45 µm	0,45 µm	centrifugation
	Conservation	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	HNO <sub>3</sub>
	Durée (h)	4	1	4
<b>Phase intestinale</b>	pH	6,5 ± 0,15	5,5 ± 0,05	7 ± 0,2
	Temps de repos (min)	25	0	0
	Volume prélevé (mL)	50	15	15
	Filtre utilisé	0,45 µm	0,45 µm	0,45 µm
	Conservation	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	HNO <sub>3</sub>
	Durée (h)	4	1	4

Les méthodes diffèrent donc suivant plusieurs paramètres. Cependant, une différence majeure entre la méthode CDM et les deux autres est que l'on ajoute à l'eau déionisée de la solution initiale une grande quantité de carbone organique via la glycine, ou la pepsine. Or le carbone organique dissous est susceptible d'accélérer la dissolution du sulfure de mercure, ainsi que d'empêcher sa précipitation si l'on suppose une compétition entre les groupes de matière organique dissoute contenant du soufre et le soufre inorganique (Ravichandran, 2004). Le soufre est un constituant mineur de la matière organique dissoute (0,5 – 0,2 % w/w) qui peut se retrouver dans les substance humiques sous des espèces réduites ou oxydées (Wallschlager *et al.*, 1998; Hesterberg *et al.*, 2001). Cependant, seules les espèces réduites sont capables de se lier au mercure (Ravichandran, 2004). Ainsi, via ces espèces, la matière organique dissoute est capable de s'adsorber à la surface du sulfure de mercure, de l'oxyder et donc d'extraire le mercure (Ravichandran *et al.*, 1998; Waples *et al.*, 2005). Ainsi, il se pourrait que le carbone organique dissous que l'on retrouve dans certaines méthodes in vitro augmente la solubilité, et donc la bioaccessibilité, du mercure. Cette augmentation devrait normalement être visible pour des échantillons contenant à l'origine beaucoup de sulfure de mercure, très peu soluble.

Les méthodes in vivo et in vitro permettent donc d'estimer la biodisponibilité et la bioaccessibilité du mercure dans les sols. Cependant celles-ci varient en fonction des propriétés physico-chimiques de sols.

## **2.6 Paramètres géochimiques influençant la biodisponibilité du mercure**

La biodisponibilité du mercure est grandement dépendante de la spéciation du mercure, ainsi que de la mobilité des différentes espèces de mercure (Stein *et al.*, 1996). De nombreux paramètres influencent la spéciation et la mobilité du mercure, et donc sa biodisponibilité dans les sols, comme le pH, la CEC, la teneur en matière organique, les conditions d'oxydoréduction, les concentrations en  $S^{2-}$ ,  $Cl^-$ ,  $OH^-$ , etc. (Andersson, 1979; Stein *et al.*, 1996; Gabriel & Williamson, 2004). Dans la suite de cette section seront



développés quelques uns des principaux paramètres qui influencent directement la biodisponibilité du mercure.

### **2.6.1      *Influence du pH***

Pour la plupart des métaux, une acidification du sol, i.e. une diminution du pH, se traduit par une diminution de l'adsorption (Johansson *et al.*, 1991). Le mercure suit également cette tendance puisque son adsorption dans les sols diminue avec le pH, car les ions  $H^+$  remplacent les ions métalliques sur les sites d'adsorption (Gabriel & Williamson, 2004). Cette diminution de l'adsorption avec la diminution du pH semble être valable à la fois pour les sols minéraux, mais également pour les sols organiques. Toutefois certains chercheurs affirment que dans certains cas, une diminution du pH entraîne une augmentation de l'adsorption du mercure sur des matières humiques (Schuster, 1991). La diminution de la mobilité à faible pH peut également provenir de la formation de sulfure de mercure très peu soluble et mobile (Johansson *et al.*, 1991). De plus, dans les sols acides, le mercure est principalement adsorbé sur la matière organique, alors que dans les sols neutres ou alcalins, le mercure est principalement retenu par les composants minéraux (Andersson, 1979).

### **2.6.2      *Influence de l'adsorption dans les sols***

Une très grande part du mercure qui provient de l'atmosphère et qui se retrouve adsorbé dans les sols l'est soit sur la matière organique, soit sur les minéraux (Kim *et al.*, 1997). Les composés organiques et inorganiques qui adsorbent le plus le mercure sont les argiles, les oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse, comme  $FeOOH$ , les sulfures de fer amorphes (sous condition réductrices) et la matière organique (substances fulviques et humiques) (Gabriel & Williamson, 2004). La matière organique (principalement les substances humiques) ainsi que les oxydes sont les composés qui adsorbent le mieux le mercure divalent  $Hg^{2+}$  (Andersson, 1979). Les argiles sont également de très bons adsorbants pour le mercure, suivant le classement suivant : illite > montmorillonite > kaolinite (Jackson, 1998).

En ce qui concerne la matière organique, il a été montré que c'était le paramètre principal pour l'adsorption du mercure dans les sols dans le cas de sols contaminés par une usine chlore-alkali (Hissler & Probst, 2006). La sorption du mercure sur la matière organique pourrait être expliquée par la formation de liaisons entre les espèces de mercure et des groupes fonctionnels de soufre réduit, tels que les groupes thiol, que l'on retrouve dans les matières humiques (Hesterberg *et al.*, 2001). Enfin certains essais ont même démontré que la teneur en carbone organique pouvait être plus importante que la CEC d'un sol lorsque l'on évaluait l'adsorption du mercure dans un sol (Yin *et al.*, 1997).

### **2.6.3      *Influence du soufre et des chlorures***

Comme on a pu le voir précédemment, le sulfure de mercure (HgS) est un composé très peu soluble et donc très peu mobile, alors que le chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>) est l'un des composés les plus solubles, donc les plus mobiles.

Le sulfure de mercure peut être directement produit dans les sols par réduction (Andersson, 1979). La majeure partie des dépôts géologiques de mercure est composée de cinabre, un type de sulfure de mercure. Il existe cependant d'autres types composés de carbonates et de silices ou alors des dépôts de type source chaude (Rytuba, 2003). Le sulfure de mercure peut également provenir de la réduction des sulfates de mercure que l'on retrouve dans les sols (Barnett *et al.*, 1997), ce qui aurait alors pour conséquence une diminution de la solubilité et donc de la mobilité du mercure. Le mercure serait également susceptible de se lier aux groupes sulfhydriles contenus dans la matière organique. Dans le cas où la matière organique se décomposerait, il pourrait en résulter la formation de sulfure de mercure.

On pourrait penser que la présence de chlorure entraînerait une diminution de l'adsorption du mercure dans les sols. Yin et al. (1996) ont toutefois montré que pour un pH neutre ou alcalin, la présence d'ions chlorures n'avait pas d'effet sur l'adsorption du mercure dans les sols. De plus, dans le cas d'une faible teneur en matière organique et

d'un pH acide, la présence d'ions chlorures ne modifie pas l'adsorption du mercure sur le sol. Cependant, on a suggéré que la mobilité du mercure, et donc sa potentielle biodisponibilité, augmentait avec le ratio chlorures/mercure total (Neculita *et al.*, 2005).

#### **2.6.4      *Influence des réactions biochimiques des espèces de mercure***

Dans les sols, plusieurs réactions biochimiques peuvent avoir lieu entre les différentes espèces de mercure, comme la méthylation du mercure divalent et la déméthylation du monométhylmercure ou du diméthylmercure (Carpi & Lindberg, 1998). Néanmoins, la réaction principale est la réduction de  $\text{Hg}^{2+}$  en  $\text{Hg}^0$ , ce qui peut entraîner la volatilisation du mercure élémentaire et donc la disparition d'une fraction du mercure du sol. Cette réduction peut avoir lieu avec ou sans l'intervention d'agents biologiques, et elle se passe généralement dans des environnement réducteurs (Schluter, 2000). Cependant, cette réduction n'a pas toujours lieu. Il a été montré qu'une forte teneur en matière organique avait tendance à inhiber la réduction de  $\text{Hg}^{2+}$ . Une explication à ce phénomène pourrait être que le mercure divalent est facilement adsorbé sur la matière organique et donc qu'il est peu disponible. Cependant, une fois le mercure élémentaire formé, sa mobilité est largement dépendante de la structure du sol, de sa sorption et de la température ambiante (Schluter, 2000).

## CHAPITRE 3

# DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Après avoir vu les principales connaissances actuelles sur le mercure (origine, répartition, biodisponibilité, toxicité...) dans la revue de littérature, ce chapitre décrit brièvement le plan de travail adopté, en présentant le travail de laboratoire effectué : les matériaux étudiés, les propriétés des sols déterminées, et les expériences réalisées afin de mener à bien ce projet. Les protocoles n'étant pas détaillés ici, on peut se reporter au chapitre 4, où, dans l'article, les manipulations sont entièrement décrites.

### 3.1 Matériaux de travail

Pour réaliser cette étude, plusieurs matériaux provenant d'origines diverses ont été utilisés. Tout d'abord, afin de s'assurer de la validité des protocoles de mesure de la bioaccessibilité, deux composés purs de mercure ont été utilisés : le chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) très soluble, et le sulfure de mercure ( $\text{HgS}$ ) extrêmement peu soluble. Ainsi, en appliquant les méthodes in vitro sur ces deux composés, on peut s'assurer de la validité de nos résultats. De plus, afin de pouvoir comparer notre étude à d'autres, deux sols certifiés, CRM 025-050 et ERM<sup>®</sup>-CC580, ont également été utilisés. Ces deux sols certifiés possédaient des concentrations élevées en mercure comparativement à nos échantillons naturels, mais les comparaisons ont quand même pu être possibles, car le CRM 025-050 est un vrai sol. ERM<sup>®</sup>-CC580 est un sédiment contaminé. Ainsi, les résultats liés à ces échantillons ont pu être intégrés dans les analyses statistiques.

Cinq sols naturels contaminés au mercure ont permis de réaliser cette étude. Il s'agit de deux sols (1 et 2) prélevés à proximité d'une usine chlore-alkali, d'un résidu minier (sol 3) prélevé à proximité d'une mine d'or située en Abitibi (Québec), et de deux résidus miniers (sols 4 et 5) prélevés à proximité d'une autre mine d'or à Montague (Nouvelle-Écosse). Le résidu minier 3 a été prélevé à 10 cm de la surface dans le front d'oxydation. Les résidus miniers 4 et 5 ont quant à eux été prélevés sur un site où le

mercure était ajouté au minerai broyé afin de récupérer l'or par amalgamation entre les années 1860 et 1940. Ces cinq sols naturels ne présentaient pas des concentrations en mercure très élevées (2,6 à 12,2 mg/kg). Ces concentrations étaient toutefois élevées par rapport aux critères A et B fixés par le Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 0,2 et 2 mg/kg respectivement, qui représente la teneur de fond et la concentration acceptable pour un terrain à usage résidentiel.

### **3.2 Propriétés des sols étudiés**

Les sols étudiés (sols de référence et sols naturels) ont été caractérisés pour différentes propriétés sur la fraction inférieure à deux millimètres : teneur en eau, pH, teneur en solides volatils, contenus en carbone total, carbone organique total, soufre total, soufre sulfate... La teneur en eau a également été déterminée sur la fraction inférieure à 250 micromètres afin d'estimer le mercure total dans le sol sec utilisé pour les méthodes in vitro. Toutes les mesures ont été faites en triplicata afin d'obtenir une moyenne et un écart-type représentatifs.

Les teneurs en eau ont été déterminées en séchant les sols pendant trois jours à 45°C pour éviter de perdre du mercure par volatilisation. Les solides volatils, qui représentent une estimation de la teneur en matière organique, ont été déterminés par perte au feu en brûlant les composés organiques au four à 550°C pendant 16 heures. Ces deux expériences se déroulent dans un four placé sous une hotte aérée en permanence afin d'éviter de contaminer l'air ambiant du laboratoire. Le pH des sols a été évalué en mélangeant 5 grammes de sols dans 10 ml d'eau distillée. Pour les analyses des contenus en soufre total, carbone total et le carbone organique total, les échantillons ont subi une combustion à haute température dans une fournaise LECO. Le soufre sulfate a quant à lui été déterminé par spectrophotométrie. Enfin les distributions granulométriques des échantillons ont été réalisées sur les matériaux bruts.

### **3.3 Fractionnement du mercure**

Le mercure total a été déterminé sur les deux fractions inférieures à deux millimètres et 250 micromètres, par une digestion avec un mélange d'acides (nitrique, sulfurique et perchlorique dans un rapport de 1:7:1) chauffée à 250°C pendant une heure. Le mercure volatil a été évalué à partir de la différence entre le mercure total et le mercure résiduel, le mercure résiduel étant déterminé par une digestion totale, après avoir placé les échantillons pendant deux jours dans un four à 180°C. Le mercure volatile fournit une surestimation de la teneur en mercure élémentaire dans le sol.

Le fractionnement du mercure a été réalisé en quatre étapes. La première, en mélangeant le sol à de l'eau, permet d'estimer la fraction soluble à l'eau. La deuxième, en mélangeant le résidu de la première étape à une solution de  $\text{CaCl}_2$ , permet d'obtenir la fraction échangeable. La troisième, en mélangeant le résidu de la seconde étape avec une solution de  $\text{NaOH}$  et une solution de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , permet d'estimer la fraction liée à la matière organique. Enfin la dernière étape, en digérant totalement le résidu de la troisième étape comme pour le mercure total, permet d'évaluer la fraction résiduelle.

Pour toutes les analyses de mercure, les expériences ont également été réalisées en triplicata avec un blanc de procédure pour s'assurer de la bonne qualité des manipulations.

### **3.4 Bioaccessibilité du mercure**

Les deux méthodes *in vitro* utilisées pour estimer la bioaccessibilité du mercure ont été les méthodes CDM et l'IVG. Ces deux méthodes sont basées sur le même principe, qui est de simuler le passage du sol à travers l'organisme d'un enfant en deux phases, soit une phase gastrique et une phase intestinale. Cependant, les deux méthodes ne présentent pas les mêmes caractéristiques : durées des phases, pH, ajouts organiques... Les résultats de la méthode CDM pour les sols certifiés, les composés purs et les sols 1 et 2, ainsi que les résultats de l'IVG pour les composés purs proviennent de l'étude de Christophe Bedeaux (Zagury *et al.*, 2008) dans le cadre de sa maîtrise-cours à l'École

Polytechnique de Montréal. Tous les autres résultats ont été déterminés en triplicata, accompagnés de blancs de procédure.

Les principales différences entre les méthodes CDM et IVG sont les durées des phases (quatre heures chacune pour la CDM et une heure chacune pour l'IVG), les pH (2,5 et 6,5 pour les phases gastrique et intestinale de la CDM et 1,8 et 5,5 pour l'IVG) et les ratios solide (g) / liquide (ml) (0.37/500 pour la CDM et 1/150 pour l'IVG). De plus au cours de deux phases de l'IVG, on rajoute de la pepsine et du NaCl (phase gastrique) ainsi que de la bile et de la pancréatine (phase intestinale), alors qu'aucun ajout n'est fait au cours de la CDM. Ces ajouts simulent de manière simplifiée les fluides gastro-intestinaux d'un enfant. Dans les deux méthodes, les échantillons sont agités et les conditions anaérobies sont maintenues. Cependant dans la méthode IVG, ces dernières sont réalisées par la diffusion de l'argon à travers la solution. Il a été nécessaire de s'assurer que les diffuseurs ne soient pas constitués de métal pour ne pas adsorber du mercure lors d'une expérience et le relarguer dans un blanc de procédure plus tard. C'est pourquoi des diffuseurs en polyéthylène ont été utilisés.

### **3.5 Analyses statistiques**

Afin d'évaluer l'influence des propriétés des sols et du fractionnement du mercure sur la bioaccessibilité, des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Statistica<sup>®</sup>. Tout d'abord, une matrice de corrélation a été calculée pour évaluer quel résultat corrélait avec quel autre. Ensuite, des régressions linéaires ont été établies entre les principaux paramètres. Et enfin, une analyse en composante principale (PCA) a permis de visualiser concrètement l'influence du fractionnement du mercure et des propriétés des sols sur la bioaccessibilité.

### **3.6 Modélisation géochimique**

Une simulation chimique a été réalisée à l'aide du logiciel VMINTEQ pour modéliser la spéciation du mercure dans la solution intestinale de la méthode IVG pour le matériel de référence CRM 025-050. Pour cela, on a mesuré les concentrations de principaux

composants de la solution intestinale (cations, anion, carbone organique dissous), ainsi que le potentiel d'oxydo-reduction.

### **3.7 Publication des résultats**

Les résultats de l'étude précédente, portant sur l'influence des propriétés de sols et du fractionnement du mercure sur la bioaccessibilité, avaient fait l'objet d'un article scientifique soumis à la revue *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Les extractions séquentielles sur les sols certifiés ainsi que sur les sols naturels m'ont permis de participer à la préparation de cet article pour lequel j'ai pu être co-auteur. Cet article ne se basait que sur la méthode CDM pour évaluer la bioaccessibilité du mercure dans les sols. Avec la méthode IVG en plus, cela m'a permis de comparer les deux méthodes de bioaccessibilité et de confirmer l'influence des propriétés des sols et du fractionnement sur la bioaccessibilité du mercure. Le chapitre suivant présente donc les résultats de l'étude de comparaison des deux méthodes, sous forme d'un article scientifique soumis à la revue *Environmental Science & Technology*.



## **CHAPITRE 4**

# **EVALUATION OF TWO IN VITRO PROTOCOLS FOR DETERMINATION OF MERCURY GASTROINTESTINAL BIOAVAILABILITY: INFLUENCE OF MERCURY FRACTIONATION AND SOIL PROPERTIES**

### **4.1     Title**

Evaluation of two in vitro protocols for determination of mercury gastrointestinal bioavailability: mercury fractionation and soil properties

### **4.2     Author and co-author**

Bruno Welfringer and Gérald J. Zagury,

Department of Civil, Geological and Mining Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

### **4.3     Abstract**

Soil ingestion by children is a significant exposure pathway to mercury (Hg). Unfortunately, no reliable in vivo results for Hg oral bioavailability determination in soils have been published. In vitro extractions enable the assessment of metals' bioaccessibility, which is an estimate of oral bioavailability. Therefore, the goal of this study was to evaluate two in vitro protocols (CDM and IVG) for determination of Hg bioaccessibility in soils, using pure Hg-compounds, reference materials (CRM 025-050 and ERM<sup>®</sup>-CC580), and field-collected soils. The influence of Hg fractionation and soil properties on Hg bioaccessibility was also investigated. In the field-collected soils, IVG bioaccessibility ranged from 1.5 to 7.5%, and was always below 3.15%, using the CDM

method. Mercury bioaccessibility in CRM 025-050 was 61.5% and 34.7%, using IVG and CDM protocols respectively, whereas Hg bioaccessibility was much lower in the certified sediment sample ERM<sup>®</sup>-CC580 (< 7%). Overall, the CDM protocol entailed lower Hg bioaccessibility values. The water-soluble and exchangeable Hg fraction was highly correlated with gastrointestinal bioaccessibility ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$  for both methods) and this fraction could be a potentially good indicator of Hg bioaccessibility. Because the IVG method is less time-consuming than the CDM protocol and includes organic physiological components that influence Hg bioaccessibility, it might be preferred for determination of Hg bioaccessibility.

**Keywords:** mercury – oral bioavailability – bioaccessibility – soil properties – fractionation

#### 4.4 Introduction

All forms of mercury (Hg) are toxic for children and exposure mainly occurs by inhalation, dermal contact, or ingestion (1). Ingestion of contaminated soils by young children during hand-to-mouth activities represents a major exposure pathway to toxic chemicals (2, 3). Children between 1 and 4 years old are the most sensitive group exposed to Hg-contaminated soil ingestion (4). Ideally, a fractionation and speciation study of soil Hg should be performed prior to every bioavailability analysis (5). For example, a soil contaminated with elemental Hg may present a greater exposure via inhalation, because of Hg<sup>0</sup> high volatility (6), whereas a soil contaminated with HgS might be less problematic because of its very low solubility (7). Methylmercury is easily absorbed in the gastrointestinal tract [90-100% (8)], but since the concentrations in soils are generally below 2 mg/kg, this species might not present a significant risk regarding soil ingestion (9). On the contrary, ingestion of soil inorganic Hg by children can be a significant exposure pathway (10).

Oral bioavailability, which can be estimated by measuring bioaccessibility, is an important factor that controls the actual exposure to soil Hg. Oral bioavailability is

defined as the fraction of an ingested contaminant that reaches the systemic circulation from the gastrointestinal tract, whereas bioaccessibility is the fraction of a soil contaminant that is soluble in the gastrointestinal tract and available for absorption (11). In vivo methods are the most appropriate way to assess gastrointestinal bioavailability (8). To our knowledge, only two studies have attempted to estimate Hg oral bioavailability (12, 13). Unfortunately, adult mice were used and the studies were not able to provide reliable estimates of relative bioavailability because of design limitations (5, 14).

In vitro methods are more convenient to assess Hg gastrointestinal bioavailability, since they are less time-consuming and easier to apply, however, whenever possible, they should be validated using appropriate QA/QC procedures and in vivo methods (15). To the authors' knowledge, the only relevant published study on Hg bioaccessibility in soils (9) used an in vitro method (CDM) applied to soils from the heavily Hg-contaminated East Fork Poplar Creek floodplain in Oak Ridge TN. This study also intended to assess the bioaccessibility of different mercury species; HgCl<sub>2</sub> and HgS bioaccessibilities were 100%, and less than 1%, respectively. The mean bioaccessibility for the 20 field-collected soils was around 5%. However, the CDM protocol is a highly simplified model of a child gastrointestinal tract, since it uses only pH-adjusted deionized water, has a very low solid:liquid ratio, and does not incorporate physiological fluids. In contrast, the in vitro gastrointestinal method (IVG) which has been recently applied for determination of Cu, Cr, and As bioaccessibility (2, 16, 17), incorporates physiological fluids and has a more realistic solid:liquid ratio. Moreover, the IVG protocol has been successfully validated against in vivo essays using juvenile swine to assess As, Pb, and Cd bioaccessibility (16, 18, 19).

Because of the lack of data on Hg bioaccessibility in solid environmental samples, the goal of this study was to test two in vitro methods (CDM and IVG) for determination of Hg bioaccessibility, by using pure Hg-compounds (HgS and HgCl<sub>2</sub>), reference materials (CRM 025-050 and ERM<sup>®</sup>-CC580) and five field-collected soils. To contribute to the validation process of the IVG method, the influence of soil properties and Hg

fractionation on bioaccessibility was also assessed using a thoroughly validated sequential extraction procedure (20).

## **4.5 Experimental Section**

### **4.5.1 *Samples and pretreatment***

Two surface soils collected near a chlor-alkali plant in Eastern Canada (samples 1 and 2), one surface soil collected near a mining site in Abitibi (Quebec, Canada) (sample 3), two surface soils collected in Montague Tailings (outskirts of Halifax, NS, Canada) (samples 4 and 5), and two reference materials (CRM 025-050 and ERM<sup>®</sup>-CC580) were analyzed for soil properties, Hg fractionation and bioaccessibility. Two pure Hg compounds (HgCl<sub>2</sub> and HgS) were also tested. All materials were stored at 4°C. The soil samples were air-dried at room temperature during 24 hours, slightly crushed to segregate soil particles and sieved <2 mm prior to all analysis. Before bioaccessibility tests, a fraction of each soil was sieved <250 µm. The two certified reference materials were used without pretreatment.

### **4.5.2 *Soil characterization***

Reference materials and soil samples (<2 mm fraction) were characterized for pH, volatile solids, total carbon (TC), total organic carbon (TOC), total sulfur (TS), and sulfate content (Sulf). Particle-size distribution was determined on bulk material, and field-collected soils were classified as clay (<2 µm), silt (2 µm – 50 µm), sand (50 µm – 2 mm) and gravel (>2 mm) according to the soil survey manual (21). The pH was measured in distilled water using a solid:liquid ratio of 1:2 according to the method of the Canadian Society of Soil Science (22), using a pH electrode (with single-junction Ag/AgCl reference; Accumet 13-620-285). Moisture content was determined at 45°C to minimize Hg volatilization (23). Volatile solids were determined at 550°C according to Karam (24). For TC, TS, and TOC analysis, samples were ground to powder for homogenisation and then analysed by high temperature combustion with an induction

furnace (LECO, St. Joseph, MI). To determine TOC, the total inorganic carbon (TIC) fraction was removed using a 2M HCl pre-treatment until no effervescence was observed, and followed by a vacuum filtration to removed the CO<sub>2</sub> produced (22). Sulfate content was measured by spectrophotometry following an HCl digestion according to EPA method 600/2-78-054 (25).

#### 4.5.3 *Total mercury and volatile mercury*

Total Hg concentration ( $n = 2$  for CRM 025-050,  $n = 5$  for ERM<sup>®</sup>-CC580, and  $n = 3$  for soils) was determined following acid digestion (20, 26), both on  $<2$  mm and  $<250$   $\mu$ m fractions. One gram ( $\pm 0.005$  g) of sample ( $0.5 \pm 0.005$  g for ERM<sup>®</sup>-CC580) was weighed in a 100 ml volumetric flask, and 2 ml of HNO<sub>3</sub>, 10 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 2 ml of HClO<sub>4</sub> were added. The digestion was performed at 250°C on a hot plate (Corning, Corning, NY; model PC 320) for one hour. The samples were then allowed to cool at room temperature. The digest was filtered (0.7  $\mu$ m) and diluted with deionized water to 100 ml. Total Hg was then measured by cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) according to method MA.200–Hg 1.0 (27). The detection limit for Hg in the liquid phase was 0.5  $\mu$ g/l. Accuracy of the digestion procedure was verified using total Hg concentrations in the reference materials. Reference values are  $99.8 \pm 31.7$  mg/kg for CRM 025-050 (28) and  $132 \pm 3$  mg/kg for ERM<sup>®</sup>-CC580 (29), and the concentrations found in this study were respectively  $83.43 \pm 0.45$  and  $102.78 \pm 2.07$  mg/kg. The measured concentration is consistent for CRM 025-050 but for the ERM<sup>®</sup>-CC580, some volatilization of Hg could explain the difference between the measured and the reference value.

Volatile Hg was analyzed after heating a 5 g-sample of soils and reference materials ( $n = 3$ ) at 45°C for three days and then at 180°C for 48 hours in a continuously aerated oven (20). One gram of each heated sample was then digested using the same procedure as for total Hg determination. Volatile Hg was calculated as the difference between total Hg concentration and residual Hg. Because temperatures  $>80^\circ\text{C}$  can remove Hg (30), these analysis were performed on separate samples.

#### **4.5.4      *Sequential extraction procedure***

The sequential extraction procedure was carried out using a method developed by Neculita et al. (20). Hg was separated in four fractions: water-soluble (F1), CaCl<sub>2</sub>-exchangeable (F2), bound to organic matter (F3), and residual (F4). The sequential extractions were performed using 2 g of accurately weighed ( $\pm 0,005$  g) soil sample mixed with 20 ml of solvent in a 50-ml polypropylene centrifuge tube. The tubes were thoroughly shaken for 2 h at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  using a mechanical wrist-action shaker (Burrell Scientific, Pittsburgh, PA, model 75). Between each of the successive extractions and rinses, the supernatant was obtained by centrifuging (Beckman, Fullerton, CA; model J2-21) at  $12\,000\times g$  for 15 to 25 min at  $10^\circ\text{C}$ . Rinsing consisted of washing the leached residues twice with distilled and deionized water (20 and 10 ml, respectively) for 15 min. The rinses were then added to the solvent extract from the same sample. The combined supernatants were analyzed for Hg by CVAAS. The solid residue was used in the next extraction step. Extractions of the water-soluble, exchangeable, and bound to organic matter fractions were performed as described above using deionized water for F1, 1M CaCl<sub>2</sub> for F2, and successively 0.2M NaOH and 4% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH for F3. After the rinse step, the residue was saved for the next extraction. Residual Hg was extracted by adding the same reagents as for total Hg to the soil pellet directly in the original 50-ml centrifuge tube. The sample was then transferred into a 100-ml standard volumetric flask. The digestion was performed using the same procedure as previously described for total Hg.

#### **4.5.5      *Bioaccessibility methods***

The CDM (9) and the IVG (16) methods were carried out to assess the bioaccessibility of mercury in the five field-collected soils ( $<250\ \mu\text{m}$ ), the two reference materials, and the pure mercury compounds.

### CDM method

The CDM method consists of adding  $0.37 \pm 0.005$  g of sample to 0.5 l of deionized water in a 1 l Erlenmeyer flask. The deionized water was previously adjusted to a pH of 2.5 with HCl and de-oxygenated for three minutes with nitrogen. For the gastric phase (a total of 4 hours of extraction at room temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ )), the samples were first shaken for 10 minutes at 125 rpm on a rotary shaker and the pH was re-adjusted. Until the end of the gastric phase, samples were stirred at 30 rpm, while the pH was readjusted to 2.5 after 30 and 60 minutes if needed. At the end of the gastric phase, shaking was stopped for 25 minutes to allow settling of samples and 50 ml of solution were collected for Hg analysis. For the intestinal phase, 4 hours of extraction at room temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 50 ml of deionized and de-oxygenized water were first added and the pH of the solution was adjusted to 6.5 with NaOH. The pH was then re-adjusted to 6.5 after 10, 30 and 60 minutes. Until the end of the intestinal phase, samples were continuously shaken at 30 rpm. Shaking was again stopped for 25 minutes, and 50 ml of solution were collected for Hg analysis.

### IVG method

Hg bioaccessibility was also determined using the physiologically based IVG protocol (2), slightly modified from Rodriguez's protocol (16). One gram of soil ( $<250 \mu\text{m}$ ) was added to 150 ml of gastric solution (0.15M NaCl, Anachemia, Lachine, Qc, Canada; ACS grade] and 1% w/v pepsin [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; n°P-7000]) in a 250 ml glass beaker placed in a  $37^\circ\text{C}$  bath. During the entire procedure the four samples ( $n = 3$  and one blank) were mixed at 100 rpm and argon was constantly bubbled through the solution to mimic anaerobic conditions (diffusers were metal-free in order to avoid Hg contamination). For the gastric phase (1 hour), the solution pH was constantly maintained at  $1.80 \pm 0.05$  with HCl. At the end of the gastric phase, 15 ml of gastric solution were sampled, filtered ( $0.45 \mu\text{m}$ ), and sent for Hg analysis. Then the intestinal phase (1 hour) was simulated by adjusting the pH at  $5.50 \pm 0.05$  with  $\text{NaHCO}_3$  followed by adding 0.49 g of porcine bile extract (Sigma Aldrich, St. Louis, MO; n°B8631) and

0.049 g of porcine pancreatin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO; n°P1500). The pH was constantly maintained at  $5.50 \pm 0.05$ . At the end, 15 ml of intestinal solution were sampled, filtered (0.45 $\mu$ m), and sent for Hg analysis. An additional IVG was performed using only procedure blanks and spiked samples to make sure that there was no contamination or Hg adsorption during the procedure.

For the two methods, Hg bioaccessibility was calculated by dividing the Hg concentration (mg/kg) measured in the in vitro gastric/intestinal solution by the total Hg concentration (mg/kg) in the soil, as described in the following equations.

$$CDM\ G\ (\%) = \frac{[Hg]_{CDM-G}}{[Hg]_{Soil}} \times 100 \quad (1)$$

$$CDM\ I\ (\%) = \frac{[Hg]_{CDM-I}}{[Hg]_{Soil}} \times 100 \quad (2)$$

$$IVG\ G\ (\%) = \frac{[Hg]_{IVG-G}}{[Hg]_{Soil}} \times 100 \quad (3)$$

$$IVG\ I\ (\%) = \frac{[Hg]_{IVG-I}}{[Hg]_{Soil}} \times 100 \quad (4)$$

With CDM G and CDM I: bioaccessible fractions of Hg at the end of the gastric and intestinal phase respectively, for the CDM method

IVG G and IVG I: bioaccessible fractions of Hg at the end of the gastric and intestinal phase respectively, for the IVG method

[Hg]Soil: total Hg concentration in soil <250  $\mu$ m (mg/kg)

[Hg]CDM-G and [Hg]CDM-I: Hg concentration (mg/kg) calculated from the values measured ( $\mu$ g/l) in the in vitro gastric and intestinal solution respectively, for the CDM method

[Hg]IVG-G and [Hg]IVG-I: Hg concentration (mg/kg) calculated from the values measured ( $\mu$ g/l) in the in vitro gastric and intestinal solution respectively, for the IVG method



The in vitro intestinal Hg concentration takes into account the mercury removed for analysis at the end of the gastric phase.

#### **4.5.6      *Geochemical modeling with VMINTEQ***

In order to assess the influence of dissolved organic carbon (DOC) on Hg speciation in the IVG gastrointestinal extract, additional solution samples (duplicates) were collected and filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) at the end of the IVG intestinal phase conducted on the CRM 025-050. These samples were analyzed for DOC,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , Mn, Fe and Al by ICP-MS, and for  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  by ionic chromatography (IC Dionex DX-100). During the IVG procedure, redox potential (Hach SensIon I) and dissolved oxygen concentration of the solution (Orion Model 1230) were occasionally monitored. The geochemical model VMINTEQ (31) was used for speciation analysis. Cations, anions, and metal concentrations, pH, temperature, and redox potential (Eh) were used as input data. Moreover, metal binding to humic substances was simulated by the NICA-Donnan model. It was assumed that 65% of DOM was fulvic acid and that 35% was humic acid (32). Default hypotheses were used regarding the nature of the DOC (the ratio of active DOM to DOC was set to 1.4).

#### **4.5.7      *Quality and statistical analyses***

For each procedure, all reagents were ACS grade or better. All glassware was soaked in 10% (v/v) nitric acid for at least 12 hours and then rinsed three times with distilled water and three times with deionized water. All other labware was sequentially washed with a phosphate-free detergent, rinsed with distilled water, cleaned with 10% (v/v) nitric acid, and finally rinsed with deionized water. In all procedure blanks and reagents, Hg concentration was below detection limits. All procedures were performed at least in triplicate ( $n = 3$ ). A correlation matrix, a principal component analysis (PCA) and multiple regressions were performed to investigate the relations between soil properties, Hg fractionation and Hg bioaccessibility. The different parameters used for the PCA were total mercury concentration (Hgtot), total carbon (TC), total organic carbon (TOC),

total sulfur (TS), sulfate content (Sulf), percentage of fines ( $<80\ \mu\text{m}$ ) (Fines), sum of fractions F1 and F2 (F1+F2) and intestinal bioaccessibility (IVG I). Only intestinal bioaccessibility was used because gastric and intestinal bioaccessibility are dependant variables and Hg absorption in the body mainly occurs in the intestinal tract (16). Statistical analyses were performed with the software STATISTICA<sup>®</sup> version 7.

## 4.6 Results and discussion

### 4.6.1 *Soil physicochemical characterization*

The physicochemical properties and the particle-size distribution of the reference materials and the five collected soils are presented in **Table 1**. The seven samples were acidic to alkaline, with pH ranging from 3.6 (soil 5) to 9.7 (soil 3). The alkaline pH of soils 1 and 2 is in agreement with the values reported for soils collected near chlor-alkali plants (20, 33), whereas the acidic pH of weathered soils 4 and 5 can be explained by their mining origin. The high pH of soil 3 must be caused by its high carbonate content (also of mining origin). Total organic carbon ranged between 2 and 56 g/kg, with soil 4 having the highest content and being highly organic. All samples had a low total sulfur content ( $<2\ \text{g/kg}$ ), except CRM 025-050 which had the highest content (12.1 g/kg), mainly in the form of sulfate (8.8 g/kg). All other soils had a low sulfate content ( $<0.3\ \text{g/kg}$ ). Volatile solids were also assessed as an estimation of the organic matter. Only ERM<sup>®</sup>-CC580 and soil 4 had a high volatile solids content (17.68% and 16.96% respectively), whereas all other materials had a volatile solids content below 5%. This was in agreement with the total carbon and total organic carbon contents.

### 4.6.2 *Total mercury and mercury fractionation*

Total Hg concentrations in the field-collected soils ( $<2\ \text{mm}$ ) ranged from  $2.6 \pm 0.2$  (soil 3) to  $12.2 \pm 0.6\ \text{mg/kg}$  (soil 1) (Table 2). In the  $<250\ \mu\text{m}$  fraction, total Hg concentrations for the field-collected soils 1 to 5 were higher and were respectively  $15.8 \pm 0.7$ ,  $7.7 \pm 0.3$ ,  $4.3 \pm 3.9$ ,  $9.3 \pm 2.3$ , and  $6.7 \pm 1.5\ \text{mg/kg}$ . Total Hg was greater in

samples showing higher total carbon and total sulfur contents. In all samples, volatile Hg ranged from 20% to 98% of total Hg (**Table 2**). Even if the measure of volatile Hg at 180°C provides an overestimation of  $\text{Hg}^0$  (30), samples with high volatile Hg content must contain mainly elemental mercury. In soil 3 (98% of volatile Hg), Hg was mostly under the form of  $\text{Hg}^0$ , probably due to its mining origin (gold amalgamation with elemental mercury, at high pH), and Hg bioaccessibility in this sample should be very low, since  $\text{Hg}^0$  is almost insoluble. For all materials, recovery of the sequential extraction procedure was highly satisfactory (close to 100%), except for CRM 025-050 (120%) (**Table 3**). CRM 025-050 was the only soil to present high water-soluble ( $F1 = 2.0\%$ ) and exchangeable ( $F2 = 46.5\%$ ) fractions ( $F1+F2 = 48.5\%$ ), and was consequently expected to present a high Hg bioaccessibility. For all other soils, the sum  $F1+F2$  was less than 2.7% of total Hg. The organic soil 4 had the highest Hg-bound to organic matter fraction (31.72%), and this fraction was significantly correlated with TOC ( $r = 0.77$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ). Hg bioaccessibility in this soil should consequently be extremely low due to the strong adsorption of Hg onto organic matter. The residual fraction ( $F4$ ) ranged from 68% (CRM 025-050) to 102% (ERM<sup>®</sup>-CC580) and may be mainly composed of  $\text{Hg}^0$  for high volatile Hg samples, or of  $\text{Hg}^0$  and mercuric sulfide ( $\text{HgS}$ ) for other samples (20). In samples showing residual fractions close to 100%, including ERM<sup>®</sup>-CC580, and in field-collected soils 1, 2, 3, and 5, Hg bioaccessibility is expected to be very low, since  $\text{Hg}^0$  and  $\text{HgS}$  are almost insoluble.

#### 4.6.3 *Bioaccessibility results*

For the two pure Hg compounds, bioaccessibility results were as expected, being functions of the solubility. Indeed,  $\text{HgCl}_2$  [solubility of 69 g/l (34)] was bioaccessible at about 100% in the gastric phase and at nearly 90% during the intestinal phase for both CDM and IVG methods. For  $\text{HgS}$  [solubility of 3.5.10-25 g/l (7)], bioaccessibility was always below 0.05% in both gastric and intestinal phases and for both methods (**Table 3**).

When applying the CDM method onto the reference materials and soils 1, 2, and 3, all bioaccessibility values were very low, as predicted by Hg fractionation, and were below 3.15% (detection limit of 0.1  $\mu\text{g/l}$ ), except for CRM 025-050 (Table 3). This reference material had the highest bioaccessibility values,  $44.3 \pm 2.8\%$  for the gastric phase and  $34.7 \pm 0.4\%$  for the intestinal phase, which was very close to the sum of the water-soluble and exchangeable fractions. Compared to results obtained by Barnett and Turner (9), the Hg bioaccessibilities in field-collected soils 1, 2, and 3 are consistent and below 5%. Hg bioaccessibility in CRM 025-050 was also highest for the IVG method ( $64.4 \pm 7.1\%$  for the gastric phase and  $61.5 \pm 8.1\%$  for the intestinal phase). Hg bioaccessibility in ERM<sup>®</sup>-CC580 showed an increase between the two IVG phases from  $1.3 \pm 0.2\%$  up to  $6.7 \pm 1.1\%$ , which might be caused by the added physiological fluids. The five field-collected soils showed IVG bioaccessibility values ranging from 1.1% (soil 4) to 4.5% (soil 3) for the gastric phase, and from 1.5% (soil 4) to 7.5% (soil 3) for the intestinal phase (Table 3). For this second method, the results for the pure Hg compounds were also in good agreement with the literature and with the values reported by Barnett and Turner (9). The Hg bioaccessibility values in all samples showed an increase between the two phases for both methods, except in CRM 025-050 and  $\text{HgCl}_2$  whose Hg bioaccessibility values showed a decrease. The behavior of the reference material can be explained by the behavior of  $\text{HgCl}_2$ , since they both show high water-soluble and exchangeable-Hg fractions (F1+F2).

For both methods, Hg gastrointestinal bioaccessibility in field-collected soils and reference materials was below 8%, except for CRM 025-050 which had the highest bioaccessibility. This difference must result from the soil physicochemical properties and Hg fractionation. Indeed, CRM 025-050 is a sandy soil which presents the lowest proportion of fines (19%), the highest sulfate content (8.8 g/kg), and shows the highest water-soluble and exchangeable-Hg fraction.

#### 4.6.4 Influence of soil properties and Hg fractionation on bioaccessibility

A principal component analysis was performed to project selected variables on the factorial plane (1, 2) (**Figure 1**). The two strongest factors explained 79.84% of the total variation. The variables most strongly correlated with factor 1 (53.10% of the total variation) were intestinal bioaccessibility [IVG I] (-0.99), the sum of fractions F1+F2 [F1+F2] (-0.99), sulfate content [Sulf] (-0.99), total sulfur [TS] (-0.97), and the proportion of fines [Fines] (0.69). The variables most highly correlated with factor 2 (26.74% of the total variation) were total carbon [TC] (0.92), soil total mercury [Hgtot] (0.74), and total organic carbon [TOC] (0.69). The PCA showed that intestinal bioaccessibility increased with the sum of fractions F1+F2 and sulfate content, but decreased with the proportion of fines. A multiple regression showed that soil total mercury was strongly correlated ( $r^2 = 0.85$ ,  $p < 0.03$ ,  $n = 7$ ) with total carbon and total sulfur (**Equation 5**).

$$Hg_{total} = B_1 \times TS + B_2 \times TC + I \quad (5)$$

With:  $B_1 = 7.59 \pm 2.07$ ,  $B_2 = 0.68 \pm 0.22$ , and  $I = -17.08 \pm 13.31$

The only soil properties correlated with in vitro gastrointestinal bioaccessibility were total sulfur ( $r = 0.97$ ,  $p < 0.001$  for IVG G; and  $r = 0.98$ ,  $p < 0.001$  for IVG I), and sulfate content ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$  for IVG G; and  $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$  for IVG I). Hg bioaccessibility must be mainly influenced by total sulfur and sulfate content. In fact, CRM 025-050 had both the highest sulfate content and Hg bioaccessibility. Usually, the presence of sulfur decreases Hg solubility and bioaccessibility, either by fixing Hg to organic matter (especially humic acids) or by trapping it in the form of mercuric (II) sulfide (35-37). However, in the case of this reference material, the high bioaccessibility values for both CDM and IVG methods could be explained by the presence of mercuric sulfate ( $HgSO_4$ ), which is a far more soluble species than mercuric sulfide. In fact, Bernaus et al. (33) found that in some chlor-alkali contaminated soils,  $HgSO_4$  constituted up to 20% of total Hg, along with  $HgS$ ,  $HgO$ , and other species. Moreover,

the presence of excess sulfides can enhance the dissolution of HgS to more soluble sulfur-complexes, like  $\text{Hg}(\text{SH})_2^0$ ,  $\text{HgS}_2\text{H}^-$ ,  $\text{HgS}_2^{2-}$ , or  $\text{HgSOH}^+$  (38-40). Benoit et al. (7) demonstrated that when dissolved sulfide increases in solution, dissolved mercury tends to increase as well. This relationship between sulfate content in soils and mercury solubility and bioaccessibility is supported by the correlation between sulfate content and the sum of water-soluble and exchangeable Hg fractions ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 7$ ).

For both methods, bioaccessibility values were well correlated with the sum of fractions F1+F2 ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$  for CDM I; and  $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 7$  for IVG I). This indicates that Hg mobility (water-soluble and exchangeable Hg) assessed through Hg fractionation is in good agreement with Hg bioaccessibility. Therefore, the sum of the water-soluble and  $\text{CaCl}_2$ -exchangeable Hg fractions (F1+F2) may be a good indicator of Hg bioaccessibility in soils.

#### ***4.6.5 Comparison of the two in vitro methods and influence of DOC on Hg bioaccessibility***

The two in vitro methods share the same objective, which is to simulate the physicochemical conditions of a child's gastrointestinal tract. However, many differences make the IVG protocol more physiologically realistic than the CDM protocol. First, the temperature ( $37^\circ\text{C}$ ) and constant mixing more efficiently reproduce the gastrointestinal physical conditions. Second, the gastrointestinal fluids (simulated with NaCl, pepsin, bile and pancreatin) better mimic the biochemical conditions of the stomach and the small intestine. These additions lead to solutions with very high DOC content. Overall, the IVG bioaccessibility values were higher than the CDM values, but the results for the two methods were highly correlated for both gastric and intestinal phases ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ , and  $r = 0.95$ ,  $p < 0.001$  respectively). Yet, the IVG method is far less time-consuming than the CDM method, since the two phases last only one hour each (four hours each in the CDM protocol), which allows one to easily perform a few IVG extractions in one day.

The intestinal bioaccessibility values were slightly increased compared to the gastric values for the CDM method, but were doubled for the IVG method. This might be the consequence of the DOC brought by the addition of the physiological elements (porcine bile and pancreatin), which is the major difference between the two methods. In fact recent studies have suggested that DOC is able to enhance cinnabar (red HgS) dissolution and inhibit metacinnabar (black HgS) precipitation (41). This phenomenon was explained by assuming a hard competition between the sulfur reduced groups in dissolved organic matter (DOM) and inorganic sulfide for the binding to Hg (42). Sulfur is a minor constituent of DOM (0.5-0.2% by weight) that can be found in humic substances, and it occurs as reduced or oxidized species (43, 44). However, only reduced species (thiol, sulfide) are able to bind mercury (42). DOM, via the thiol or sulfide sites, is susceptible to adsorb on HgS and oxidize its surface by fixing and extracting Hg (41, 45). Thus, an important DOC content may release soluble DOC-Hg, and then increase Hg solubility and bioaccessibility. In this present study, Hg from the residual fractions (mainly Hg<sup>0</sup> and HgS) may have been dissolved by the high DOC content, resulting in higher IVG gastrointestinal bioaccessibility values in all samples. During the IVG protocol for CRM 025-050, an extremely high DOC concentration of 5650 mg C/l was recorded. Geochemical modeling showed that under gastrointestinal conditions, Hg was mostly (97%) bound to fulvic acids (FA) from DOC, which is consistent knowing that FA are soluble at all pH (46). The high DOC content measured in the IVG extracts, compared to the CDM extracts, may be responsible for an important dissolution of otherwise insoluble Hg-species, like HgS, causing higher bioaccessibility values. Since the IVG method is less time-consuming than the CDM protocol and includes organic physiological components which bring a high DOC content which enhances Hg solubility, it might be preferred for determination of Hg bioaccessibility.

#### 4.7 Acknowledgments

The authors gratefully thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for its financial support. Thanks also due to Christophe Bedeaux, Manon Leduc, Lucie Jean, Carmen Neculita, Éric Girouard, and Dr. John Molson.

#### 4.8 References

1. Goldman, L. R.; Shannon, M. W. Technical report: Mercury in the environment: Implications for pediatricians. *Pediatrics* **2001**, 108, 197-205.
2. Pouschat, P.; Zagury, G. J. In Vitro Gastrointestinal Bioavailability of Arsenic in Soils Collected Near Cca-Treated Utility Poles. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 4317-4323.
3. U.S. EPA Volume V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds. <http://www.epa.gov/mercury/report.htm> (June),
4. Nusslein, F.; Feicht, E. A.; Schulte-Hostede, S.; Seltmann, U.; Kettrup, A. Exposure analysis of the inhabitants living in the neighbourhood of a mercury-contaminated industrial site. *Chemosphere* **1995**, 30, 2241-2248.
5. Kelley, M. E.; Brauning, S. E.; Schoof, R. A.; Ruby, M. V. Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. Battelle Press: Columbus, 2002; p 136.
6. Counter, S. A.; Buchanan, L. H. Mercury Exposure in Children: a Review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, 198, 209-230.
7. Benoit, J. M.; Gilmour, C. C.; Mason, R. P.; Heyes, A. Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 951-957.
8. Canady, R. A.; Hanley, J. E.; Susten, A. S. ATSDR science panel on the bioavailability of mercury in soils: Lessons learned. *Risk Anal.* **1997**, 17, 527-532.



9. Barnett, M. O.; Turner, R. R. Bioaccessibility of Mercury in Soils. *Soil. Sediment. Contam.* **2001**, 10, 301-316.
10. U.S Department of Energy East Fork Poplar Creek Sewer Line Beltway Remedial Investigation Report; DOE/OR/02-1119&D2; Oak Ridge, Tennessee, 1994.
11. Ruby, M. V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D. E.; Casteel, S. W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D.; Chappell, W. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 3697-3705.
12. Revis, N. W.; Osborne, T. R.; Holdsworth, G.; Hadden, C. Mercury in Soil - a Method for Assessing Acceptable Limits. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, 19, 221-226.
13. Sheppard, S. C.; Evenden, W. G.; Schwatz, W. J. Ingested Soil - Bioavailability of Sorbed Lead, Cadmium, Cesium, Iodine, and Mercury. *J. Environ. Qual.* **1995**, 24, 498-505.
14. Paustenbach, D. J.; Bruce, G. M.; Chrostowski, P. Current Views on the Oral Bioavailability of Inorganic Mercury in Soil: Implications for Health Risk Assessments. *Risk Anal.* **1997**, 17, 533-544.
15. Zagury, G. J. Comments on "Effect of soil properties on arsenic fractionation and bioaccessibility in cattle and sheep dipping vat sites" by D. Sarkar et al. (2007) *Environment International* 33 (2007) 164-169. *Environ. Int.* **2007**, 33, 712-713.
16. Rodriguez, R. R.; Basta, N. T.; Casteel, S. W.; Pace, L. W. An in Vitro Gastrointestinal Method to Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 642-649.
17. Pouschat, P.; Zagury, G. J. Bioaccessibility of chromium and copper in soils collected near CCA-treated wood poles. *Pract. Periodical of Haz., Toxic, and Radioactive Waste Mgmt.*, ASCE **2008**, In Press.

18. Basta, N. T.; Casteel, S. W.; Rodriguez, R. R. Development of Chemical Methods to Assess the Bioavailability of Arsenic in Contaminated Media; Nation Center for Environmental Research: Washington, DC, 2001; pp 1-40.
19. Schroder, J. L.; Basta, N. T.; Casteel, S. W.; Evans, T. J.; Payton, M. E.; Si, J. Validation of the In Vitro Gastrointestinal (IVG) Method to Estimate Relative Bioavailable Lead in *Contaminated Soils*. **2004**, 33, 513-521.
20. Neculita, C.-M.; Zagury, G. J.; Deschênes, L. Mercury Speciation in highly Contaminated Soils from Chlor-Alkali Plants Using Chemical Extractions. *J. Environ. Qual.* **2005**, 34, 255-262.
21. Soil Survey Division Staff Soil Survey Manual. <http://soils.usda.gov/technical/manual/contents/chapter3e.html> (May),
22. Carter, M. R. Soil sampling and methods of analysis. Lewis Publishers: Ottawa, ON, 1993; p 823.
23. Sakamoto, H., Tomiyasu T, Yonehara N. The content and chemical forms of mercury in sediments from Kagoshima Bay, in comparison with Minamata Bay and Yatsushiro Sea, southwestern Japan. *Geochem. J.* **1995**, 29, 97-105.
24. Karam, A. Chemical Properties of Organic Soils. In Soil Sampling and Methods of Amalysis, Carter, M. R., Ed. Lewis: Boca Raton, FL, 1993.
25. Sobek, A. A.; Schuller, W. A.; Freeman, J. R.; Smith, R. M., Field and laboratory Methods Applicable to Overburdens and Minesoils. In U.S. EPA: 1978; Vol. EPA-600/2--78-054, pp 60-62.
26. Akagi, H.; Nishimura, H. Speciation of mercury in the environment. In Advances in mercury toxicology, Susuki T, N. I., Clarkson TW, Ed. Plenum Press: New York, NY, 1991; pp 53-76.
27. CEAEQ, Détermination du mercure : dosage par spectrophotométrie d'absorption atomique, formation de vapeur. In 1997; Vol. MA. 200 - Hg 1.0, pp 1-14.

28. RTC Loamy Sand - Trace Metals <http://www.rtc-corp.com/products/n1064.aspx> (June),
29. ERM Certificate of analysis - ERM(R)-CC580; Geel, Belgium, 2005.
30. Sladek, C.; Gustin, M. S. Evaluation of sequential and selective extraction methods for determination of mercury speciation and mobility in mine waste. *Appl. Geochem.* **2003**, 18, 567-576.
31. Gustafsson, J. P. Visual MINTEQ. Departement of Land and Water Resources Engineering: Stockholm, 2006.
32. Gustafsson, J. P.; Kleja, D. B. Modeling Salt-Dependent Proton Binding by Organic Soils with the NICA-Donnan and Stockholm Humic Models. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 5372-5377.
33. Bernaus, A.; Gaona, X.; Van Ree, D.; Valiente, M. Determination of Mercury in Polluted Soils Surrounding a Chlor-Alkali Plant - Direct Speciation by X-Ray Absorption Spectroscopy Techniques and Preliminary Geochemical Characterisation of the Area. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 565, 73-80.
34. Schroeder, W. H.; Munthe, J.; Lindqvist, O. Cycling of mercury between water, air, and soil compartments of the environment. *Water Air Soil Pollut.* **1989**, 48, 337-347.
35. Andersson, A. Mercury in soils. In *The biogeochemistry of mercury in the environment*, Nriagu, J. O., Ed. Elsevier, North-Holland Biomedical Press: 1979.
36. Schuster, E. The Behavior of Mercury in the Soil With Special Emphasis on Complexation and Adsorption Processes - a Review of the Literature. *Water, Air, Soil Pollut.* **1991**, 56, 667-680.
37. Gabriel, M. C.; Williamson, D. G. Principal Biogeochemical Factors Affecting the Speciation and Transport of Mercury Through the Terrestrial Environment. *Environ. Geochem. Health* **2004**, 26, 421-434.

38. Paquette, K.; Helz, G. Solubility of Cinnabar (Red Hgs) and Implications for Mercury Speciation in Sulfidic Waters. *Water, Air, Soil Pollut.* **1995**, 80, 1053-1056.
39. Jay, J. A.; Morel, F. M. M.; Hemond, H. F. Mercury speciation in the presence of polysulfides. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 2196-2200.
40. Drott, A.; Lambertsson, L.; Bjorn, E.; Skyllberg, U. Importance of dissolved neutral mercury sulfides for methyl mercury production in contaminated sediments. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 2270-2276.
41. Ravichandran, M.; Ryan, J. N.; Aiken, G. R.; Reddy, M. M. Enhanced dissolution of cinnabar (mercuric sulfide) by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 3305-3311.
42. Ravichandran, M. Interactions Between Mercury and Dissolved Organic Matter - a Review. *Chemosphere* **2004**, 55, 319-331.
43. Wallschlager, D.; Desai, M. V. M.; Spengler, M.; Windmoller, C. C.; Wilken, R. D. How Humic Substances Dominate Mercury Geochemistry in Contaminated Floodplain Soils and Sediments. *J. Environ. Qual.* **1998**, 27, 1044-1054.
44. Hesterberg, D.; Chou, J. W.; Hutchison, K. J.; Sayers, D. E. Bonding of Hg(II) to Reduced Organic, Sulfur in Humic Acid as Affected by S/Hg Ratio. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 2741-2745.
45. Waples, J. S.; Nagy, K. L.; Aiken, G. R.; Ryan, J. N. Dissolution of cinnabar (HgS) in the presence of natural organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2005**, 69, 1575-1588.
46. Stevenson, F. J. Humus Chemistry. Wiley-Interscience: New York, NY, 1982.

**Table 4.1 – Physicochemical properties, particle size distribution, and USDA classification of the two reference materials and the five field-collected soils (n = 3)**

Sample	pH	g/kg of dry soil					%				Classification
		Total carbon	Organic carbon	Total sulfur	Sulfate content	Volatile solids	Clay	Silt	Sand	Fines (<80 µm)	
CRM 02	7.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	14.4 ± 1.3	10.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.3	8.8 ± 0.9	3.71 <sup>a</sup>	-	-	-	19.0	Sandy Loam
ERM <sup>®</sup> -CC580	8.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	115.3 ± 2.1	37.0 ± 5.7 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	17.68	-	-	-	84.0	- <sup>b</sup>
Soil 1	7.3 ± 0.1	26.4 ± 0.2	6.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.1	4.33	41.0	28.0	31.0	47.6	Clay
Soil 2	7.8 ± 0.1	15.3 ± 0.2	12.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	4.51	53.0	24.0	23.0	70.2	Clay
Soil 3	9.7 ± 0.0	25.1 ± 0.9	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	0.1 ± 0.0	2.08	5.5	68.5	26.0	83.6	Silty loam
Soil 4	5.6 ± 0.1	69.8 ± 7.4	55.8 ± 0.8	1.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	16.96	3.0	52.0	45.0	61.8	Loam
Soil 5	3.6 ± 0.1	4.03 ± 0.3	3.2 ± 0.2	1.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.20	2.0	22.0	76.0	29.0	Silty loam

<sup>a</sup> n = 2

<sup>b</sup> Sediment

**Table 4.2 - Total Hg, volatile Hg, and Hg fractionation for the 2 reference materials and the five field-collected-soils (<2 mm) (n = 3)**

Samples	Total Hg		Volatile Hg		Fraction F1 (water-soluble)		Fraction F2 (exchangeable)		Fraction F3 (organic-bound)		Fraction F4 (residual)		Sum of fractions		Recovery <sup>c</sup>	
	mg/kg		mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%		%
CRM 025-50	82.29 ± 2.01 <sup>b</sup>		53.68 ± 3.63		1.61 ± 0.18	2.0 ± 0.2	38.24 ± 15.50	46.47 ± 18.84	2.95 ± 0.31	3.59 ± 0.37	55.74 ± 5.62	67.74 ± 6.84	98.54 ± 11.50		120 ± 14	
ERM <sup>®</sup> -CC580 <sup>a</sup>	106.68 ± 2.15		21.67 ± 0.44		0.82 ± 0.41	0.8 ± 0.4	0.59 ± 0.13	0.55 ± 0.12	0.87 ± 0.06	0.82 ± 0.06	109.08 ± 7.40	102.25 ± 6.94	111.41 ± 7.02		104 ± 7	
Soil 1	12.15 ± 0.60		9.35 ± 0.84		0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.07	0.02 ± 0.01	0.19 ± 0.13	0.07 ± 0.01	0.56 ± 0.05	12.15 ± 1.08	99.95 ± 8.91	12.24 ± 1.08		101 ± 9	
Soil 2	5.87 ± 0.45		4.30 ± 0.55		0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.18	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.18	0.07 ± 0.01	1.21 ± 0.13	5.95 ± 0.30	101.29 ± 5.19	6.03 ± 0.32		103 ± 5	
Soil 3	2.61 ± 0.17		2.56 ± 0.17		0.02 ± 0.00	0.86 ± 0.12	0.02 ± 0.01	0.86 ± 0.31	0.12 ± 0.01	4.51 ± 0.42	2.62 ± 0.06	100.37 ± 2.39	2.78 ± 0.06		107 ± 2	
Soil 4	7.58 ± 2.17		4.04 ± 2.24		0.12 ± 0.02	1.52 ± 0.28	0.06 ± 0.02	0.85 ± 0.31	2.40 ± 0.31	31.72 ± 4.05	5.59 ± 0.45	73.82 ± 5.88	8.18 ± 0.61		108 ± 8	
Soil 5	5.16 ± 1.08		1.36 ± 1.53		0.05 ± 0.02	0.96 ± 0.35	0.09 ± 0.02	1.72 ± 0.35	0.09 ± 0.00	1.74 ± 0.04	4.84 ± 0.30	93.78 ± 5.87	5.06 ± 0.34		98 ± 6	

<sup>a</sup> The sequential extraction was performed in duplicate for the sediment reference material

<sup>b</sup> n = 2

<sup>c</sup> Calculated as:  $\frac{\text{sum of extracted Hg fractions}}{\text{total Hg}} \times 100$

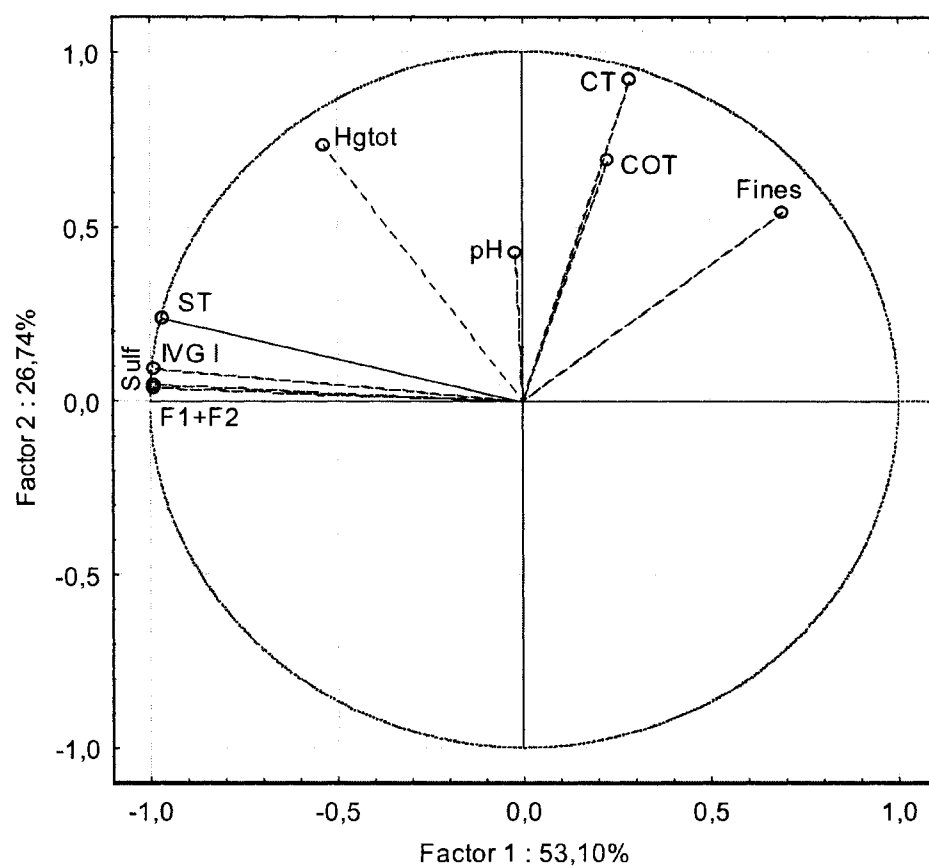
**Table 4.3 – Bioaccessibility on pure Hg compounds, reference materials and field-collected soils (<250 µm fraction) using two different in vitro methods (n = 3)**

Sample	CDM method (Barnett & Turner, 2001)		IVG method (Pouschat & Zagury, 2006)	
	Gastric Phase	Intestinal Phase	Gastric Phase	Intestinal Phase
	%			
<i>HgS</i>	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01
<i>HgCl<sub>2</sub></i>	99.72 ± 7.31	88.63 ± 8.30	101.85 ± 3.63	79.93 ± 4.17
<i>CRM 025-050</i>	44.34 ± 2.84	34.74 ± 0.44	64.42 ± 7.10	61.52 ± 8.06
<i>ERM®-CC580</i>	0.12 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.18	6.71 ± 1.07
<i>Soil 1</i>	0.93 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.36 ± 0.60	3.45 ± 0.53
<i>Soil 2</i>	2.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.21 ± 0.01	2.07 ± 0.42
<i>Soil 3</i>	3.14 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.46 ± 2.24	7.53 ± 1.46
<i>Soil 4</i>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	1.07 ± 0.18	1.50 ± 0.32
<i>Soil 5</i>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	1.61 ± 0.65 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.16 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> below detection limit (0.1 µg/L)

<sup>b</sup> n = 2

<sup>c</sup> Not determined



**Figure 4.1 - Principal Component Analysis applied to soil properties, sum of fractions F1+F2, and intestinal IVG bioaccessibility (n = 7)**



## **CHAPITRE 5**

# **DISCUSSIONS GÉNÉRALES ET CONCLUSIONS**

L'objectif principal de ce projet était de contribuer à la validation de la méthode IVG pour la bioaccessibilité du mercure dans les sols contaminés, en la comparant à la méthode CDM. Pour cela les résultats des méthodes CDM et IVG sur deux composés purs, deux sols de référence et cinq sols naturels ont été comparés. De plus, afin d'évaluer l'influence des propriétés des sols et du fractionnement du mercure sur la bioaccessibilité, les échantillons (sols certifiés et sols naturels) ont été caractérisés pour de nombreuses propriétés (pH, solides volatils, carbone total, carbone inorganique total, soufre total, teneur en sulfate, distribution granulométrique) et une extraction séquentielle a permis de fractionner le mercure total en quatre fractions : soluble à l'eau (F1), échangeable (F2), liée à la matière organique (F3) et résiduelle (F4).

Les analyses en mercure total ont montré que les concentrations dans les sols certifiés (82,3 mg/kg pour CRM 025-050 et 106,7 mg/kg pour ERM<sup>®</sup>-CC580) étaient largement supérieures à celles mesurées dans les sols naturels (2,6 à 12,2 mg/kg). À titre de comparaison, ces teneurs en mercure total sont au-dessus des critères A (concentration de fond dans le sol) et B (concentration maximale acceptable dans un terrain à vocation résidentielle) fixés par le Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, valant respectivement 0,2 et 2 mg/kg. Le fractionnement du mercure dans les sols certifiés et naturels a mis en lumière plusieurs différences entre les échantillons : (1) le CRM 025-050 est caractérisé par une fraction F1 (2 %) relativement élevée par rapport aux autres sols, ainsi qu'une fraction F2 très élevée (46,5 %) ; (2) tous les autres échantillons ont présenté une fraction soluble et échangeable (F1+F2) inférieure à 2,7 % ; (3) le sol 4 ayant une forte teneur en solides volatils et un contenu en carbone organique total très élevé a également présenté une fraction F3 importante (32 %) comparativement au ERM<sup>®</sup>-CC580, aussi organique mais avec une fraction F3 de seulement 0,87 %. La récupération (somme des quatre fractions) était proche de

100 % pour tous les échantillons ( $105,8 \pm 7,0$  %). Seul le CRM 025-050 présentait une récupération plus élevée (119 %).

Les résultats de bioaccessibilité pour les deux méthodes utilisées ont concordé avec les résultats d'études précédentes, notamment en s'assurant que les bioaccessibilités du mercure pour les composés purs  $\text{HgCl}_2$  et  $\text{HgS}$  approchaient respectivement 100 % et 0 %, et que pour la méthode CDM, les valeurs de bioaccessibilité du mercure dans les sols naturels ne dépassaient pas 5 %. En comparant statistiquement les résultats de bioaccessibilité pour les méthodes CDM et IVG, les deux phases gastrique et intestinale sont fortement corrélées entre elles ( $r = 0,99$  et  $p < 0,001$  ; et  $r = 0,95$  et  $p < 0,001$  respectivement). Pour ces deux méthodes, la bioaccessibilité du mercure a été maximale dans le matériel de référence CRM 025-050 (34,74 % pour la phase intestinale de la CDM et 61,52 % pour la phase intestinale de l'IVG). Pour la méthode CDM, les valeurs de bioaccessibilité pour les autres échantillons ont toutes été sous la limite de détection, soit inférieures à 3.2 %. Pour la méthode IVG, les valeurs de bioaccessibilités intestinales s'échelonnaient entre 1,5 % (sol 4) et 7,53 % (sol 3). Pour les deux méthodes, toutes les valeurs de bioaccessibilité dans tous les échantillons ont donc été inférieures à 7,53 %, excepté pour le matériel de référence CRM 025-050 qui lui a présenté des valeurs de bioaccessibilité du mercure beaucoup plus élevées. Cette différence peut être expliquée par le fait que CRM 025-050 est un sol contenant très peu de particules fines (19 %) et présentant une forte teneur en soufre sulfate.

Lors des analyses statistiques, les deux seules propriétés des sols qui sont corrélées avec la bioaccessibilités intestinale du mercure lors de l'IVG sont le soufre total ( $r = 0,98$  et  $p < 0,001$ ) et la teneur en sulfate ( $r = 0,99$  et  $p < 0,001$ ). Habituellement, la présence de soufre est censée réduire la mobilité, et donc la bioaccessibilité, du mercure, soit en le fixant sur la matière organique, particulièrement avec les acides humiques, ou en le piégeant sous forme de sulfure de mercure ( $\text{HgS}$ ). Cependant, dans le cas du CRM 025-050, comme la teneur en sulfate est très élevée, le mercure peut se complexer avec des sulfates plutôt qu'avec des sulfures. Or le sulfate de mercure ( $\text{HgSO}_4$ ) est une espèce beaucoup plus soluble que le sulfure de mercure qui est pratiquement insoluble. De plus,

des études ont montré que la présence de soufre en excès dans une solution est susceptible d'augmenter la solubilité du sulfure de mercure, qui se transformerait alors en espèces beaucoup plus solubles. Pour les deux méthodes, on a également constaté que les résultats de bioaccessibilité intestinale du mercure corrôlaient fortement avec la somme des fractions soluble et échangeable ( $F1+F2$ ) ( $r=0,99$  et  $p < 0,001$  et  $n = 5$  pour la méthode CDM ;  $r = 0,99$  et  $p < 0,001$  et  $n = 7$  pour la méthode IVG). Ceci indique donc que la fraction soluble à l'eau et échangeable du mercure contenu dans un sol est fortement en relation avec sa bioaccessibilité. La somme  $F1+F2$  est donc un bon indicateur de la bioaccessibilité du mercure. Dans le cas de la méthode CDM, la somme  $F1+F2$  sous-estime cependant la bioaccessibilité du mercure dans le cas des trois sols naturels étudiés. Alors que pour la méthode IVG, la somme  $F2+F2$  sous-estime la bioaccessibilité du mercure pour tous les échantillons, sauf pour les sols 4 et 5 où les deux valeurs sont pratiquement égales.

Pour ce qui est de la comparaison entre les deux méthodes de mesure de la bioaccessibilité du mercure, on a vu précédemment que les deux phases gastrique et intestinale ont très bien corrôlé entre elles. Cependant, les résultats pour la méthode CDM étaient tous en dessous de la limite de détection, sauf pour le CRM 025-050. Alors que les résultats de la méthode IVG étaient tous mesurables et les bioaccessibilités du mercure dans les sols naturels pouvaient atteindre 7.53 %. Bien qu'elles soient basées sur le même principe, à savoir simuler le passage du sol dans l'estomac puis l'intestin d'un enfant, les deux méthodes présentent des différences importantes. En effet, le rapport solide/liquide est bien plus élevé et réaliste dans la méthode IVG. De plus, au cours des deux phases de l'IVG, on ajoute de la pepsine (phase gastrique), de la bile et de la pancréatine (phase intestinale). Ces ajouts organiques apportent une grande concentration en carbone organique dissous (COD) dans la solution. Or, plusieurs études ont montré que de fortes teneurs en COD sont capables d'accélérer la dissolution d'espèces de mercure supposées insolubles, comme le sulfure de mercure, et donc de relarguer des espèces de mercure plus solubles. Cet apport en COD pourrait donc être à l'origine des plus fortes valeurs de bioaccessibilité du mercure que l'on retrouve avec la

méthode IVG comparativement à la méthode CDM. Ceci est concordant avec les résultats obtenus lors de la simulation chimique avec le logiciel VMINTEQ. En effet, celle-ci a montré que la quasi-totalité du mercure (97 %) était complexée aux acides fulviques, composants de la matière organique, ce qui montre bien que l'ajout de DOC a permis la solubilisation d'une fraction du mercure.

En comparant les résultats obtenus avec des études précédentes utilisant la méthode CDM et en comparant les résultats des deux méthodes entre eux, on contribue au processus de validation de la méthode IVG. Cependant, il faudrait compléter cette validation par des tests *in vivo* qui soient concluants. Néanmoins cette étude aura permis de montrer que la bioaccessibilité du mercure dans des sols contaminés étaient relativement faible (inférieure à 8 %) que ce soit pour la méthode CDM ou la méthode IVG. De plus, la méthode IVG, grâce à son approche plus réaliste, devrait être utilisée pour déterminer la bioaccessibilité du mercure dans les sols contaminés.

Le CDI permet de se faire une idée du risque que représente le mercure dans de tels sols. En supposant, pour un enfant de 2 à 6 ans, une ingestion quotidienne de sol de 100 mg/jour, une masse corporelle de 15,8 kg, une fréquence d'exposition de 0,5 (182 jour/an), une bioaccessibilité de 10%, une concentration de mercure dans le sol de 15 mg/kg, une durée d'exposition de 3 ans et un temps moyen d'exposition de 70 ans (25567,5 jours), un enfant pourrait ingérer jusqu'à  $2 \cdot 10^{-7}$  mg Hg/kg/jour. Comparativement, la dose de référence pour le chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ), RfD est de  $3 \cdot 10^{-4}$  mg Hg/kg/jour. Ainsi, l'indice de danger vaudrait 0,07 %, ce qui est très faible. Même pour un sol comme le CRM 025-050 ayant une bioaccessibilité de 70 % et une concentration en mercure de 100 mg/kg, on obtient un CDI de  $9,5 \cdot 10^{-6}$  mg Hg/kg/jour, ce qui correspond à un indice de danger de 3,2 %. Néanmoins, lorsque l'on est en présence d'un sol fortement contaminé (pouvant aller jusqu'à 11500 ppm), la problématique devient tout autre. Le chapitre suivant fournit donc quelques recommandations qui pourraient servir pour les prochaines études.

## CHAPITRE 6

### RECOMMANDATIONS

Les recommandations qui font suite à cette étude portent sur trois aspects du projet. Tout d'abord, il faudrait reconsidérer les méthodes in vitro CDM et IVG afin de s'assurer de leur validité. Ensuite, il faudrait s'intéresser plus particulièrement à la spéciation du mercure dans les sols, ainsi que dans les solutions gastro-intestinales. Enfin, d'autres sols et d'autres caractéristiques physico-chimiques pourraient être étudiés afin d'obtenir un éventail plus large du type de contaminations au mercure que l'on retrouve dans les sols.

Seule la méthode in vitro CDM a déjà été utilisée pour estimer la bioaccessibilité du mercure, alors que la méthode IVG a été employée pour déterminer la bioaccessibilité d'autres métaux et métalloïdes (As, Cd, Pb...). Par ailleurs, aucune de ces deux méthodes, ni aucune autre, n'a été validée avec des tests in vivo pour le mercure. Dans cette étude, des composés purs ainsi que des sols certifiés ont été utilisés et les résultats des deux protocoles ont été comparés. C'est pourquoi, afin de pouvoir réellement statuer sur la validité de ces méthodes, il serait judicieux d'avoir recours à des tests in vivo, qui permettraient de mesurer la quantité de mercure en sortie du système gastro-intestinal ou dans le sang. On pourrait également envisager de mettre en place, dans les méthodes in vitro, une étape simulant l'absorption du mercure dans le système gastro-intestinal, par exemple un gel pouvant adsorber le mercure, mais qui ne réagirait pas durant l'expérience. De plus on pourrait également s'assurer que l'on simule bien les fluides gastro-intestinaux d'un enfant avec les ajouts de bile, de pepsine et de pancréatine. Éventuellement, on pourrait essayer d'optimiser ces ajouts afin d'être plus proche de la réalité. D'autres méthodes, comme la méthode SBRC, pourraient également être utilisées pour estimer la bioaccessibilité du mercure. Un point important de la validation consiste également à appliquer les méthodes in vitro sur un plus grand nombre de sols. En effet, cinq sols naturels ont ici été utilisés, ce qui est peu représentatif et pourrait

conduire à des interprétations erronées. En utilisant plus de sols ( $n > 5$ ) qui proviennent de terrains contaminés de diverses manières et à différents niveaux, ainsi qu'avec des propriétés physico-chimiques différentes, on serait en mesure de comparer avec plus de certitude les résultats de bioaccessibilité. Par exemple, on pourrait étudier des sols contaminés prélevés dans des bacs à sable de certaines villes, là où les enfants sont susceptibles d'aller jouer souvent. Par ailleurs ces échantillons d'origines diverses permettront de mieux rendre compte de toutes les espèces de mercure et d'évaluer leur devenir potentiel si elles venaient à être ingérées.

Ce projet aura également permis de confirmer l'importance de certaines propriétés physico-chimiques des sols par rapport à la bioaccessibilité. Ainsi, le soufre sulfate et le soufre sulfure sont fortement corrélés avec la bioaccessibilité. On a également montré que la bioaccessibilité d'un sol diminue avec sa fraction fine ( $< 80 \mu\text{m}$ ). Cependant, il existe d'autres paramètres qui influencent la mobilité ou la solubilité du mercure dans les sols, comme la teneur en chlorure, la CEC... Ces autres propriétés pourraient être étudiées afin de mieux comprendre les mécanismes de rétention ou de relargage des différentes espèces de mercure dans les sols. Certains résultats pourraient venir corrélérer avec la bioaccessibilité, comme par exemple, dans le cas d'un sol ayant une CEC très élevée, la bioaccessibilité du mercure devrait être très faible.

La toxicité du mercure dépend essentiellement de sa spéciation. Par exemple si le mercure est sous forme de sulfure de mercure, il est très peu soluble et donc très peu bioaccessible. Si au contraire, le mercure est sous forme méthylée, il devient très soluble et donc très bioaccessible. La spéciation du mercure est donc un paramètre essentiel à étudier lors de l'évaluation du risque pour un sol contaminé. Il serait donc intéressant de connaître la spéciation du mercure, non seulement dans le sol que l'on étudie, mais également dans la solution gastrique et intestinale des méthodes *in vitro*. La modélisation géochimique présentée dans cette étude est relativement basique, mais a montré, sur un sol, que dans la phase intestinale de la méthode IVG, le mercure solubilisé se trouvait relié essentiellement aux acides fulviques de la matière organique dissoute. Il serait également instructif de savoir si des processus de méthylation du

mercure ont lieu durant la méthode IVG, ou dans l'estomac, en présence de bactéries. Dans le cas où il y aurait de la méthylation, l'ingestion de sol contaminé au mercure pourrait devenir plus problématique et représenter un plus grand danger pour les enfants.

Toutefois, les résultats de cette étude tendent à montrer, pour le moment, que l'ingestion de sol contaminé au mercure ne représente pas un grand danger pour les enfants. Il faudrait néanmoins tenir compte de plus de phénomènes, notamment au niveau de la spéciation du mercure dans le système gastro-intestinal.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andersson, A. (1979). Mercury in soils. In J. O. Nriagu (Ed.), *The biogeochemistry of mercury in the environment*: Elsevier, North-Holland Biomedical Press.
- ATSDR. (1999). Toxicological Profiles for mercury. Retrieved February, 2008, from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>
- ATSDR. (2001). Mercury - Minimal Risk Levels (MRLs) for Hazardous Substances. Retrieved January, 2008, from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46-a.pdf>
- Barnett, M. O., Harris, L. A., Turner, R. R., Stevenson, R. J., Henson, T. J., Melton, R. C., et al. (1997). Formation of Mercuric Sulfide in Soil. *Environmental Science & Technology*, 31(11), 3037-3043.
- Barnett, M. O., & Turner, R. R. (2001). Bioaccessibility of Mercury in Soils. *Soil & Sediment Contamination*, 10(3), 301-316.
- Benoit, J. M., Gilmour, C. C., Mason, R. P., & Heyes, A. (1999). Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environmental Science & Technology*, 33(6), 951-957.
- Bernaus, A., Gaona, X., Van Ree, D., & Valiente, M. (2006). Determination of Mercury in Polluted Soils Surrounding a Chlor-Alkali Plant - Direct Speciation by X-Ray Absorption Spectroscopy Techniques and Preliminary Geochemical Characterisation of the Area. *Analytica Chimica Acta*, 565(1), 73-80.
- Boudou, A., Dominique, Y., Cordier, S., & Frery, N. (2006). Les chercheurs d'or et la pollution par le mercure en Guyane française : conséquences environnementales et sanitaires. *Environnement, Risques & Santé*, 5(3), 167-179.
- Buchter, B., Davidoff, B., Amacher, M. C., Hinz, C., Iskandar, I. K., & Selim, H. M. (1989). Correlation of Freundlich  $K_d$  and N Retention Parameters with Soils and Elements. *Soil Science*, 148(5), 370-379.
- Camp Dresser and Mc Kee Inc. (1992). *Almaden Quicksilver County Park Risk Assessment, Final Report, Volume II - Apendices*. Denver.



- Carpi, A., & Lindberg, S. E. (1998). Application of a Teflon(TM) Dynamic Flux Chamber for quantifying soil mercury flux: tests and results over background soils. *Atmospheric Environment*, 32, 873-882.
- Carpi, A., Weinstein, L. H., & Ditz, D. W. (1994). Bioaccumulation of Mercury by Sphagnum Moss near a Municipal Solid-Waste Incinerator. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 44(5), 669-672.
- Counter, S. A., & Buchanan, L. H. (2004). Mercury Exposure in Children: a Review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(2), 209-230.
- Davis, A., Bloom, N. S., & Hee, S. S. Q. (1997). The Environmental Geochemistry and Bioaccessibility of Mercury in Soils and Sediments: a Review. *Risk Analysis*, 17(5), 557-569.
- Duggan, M. J., & Inskip, M. J. (1985). Childhood Exposure to Lead in Surface Dust and Soil: A Community Health Problem. *Public Health Reviews*, 13, 1-54.
- Fitzgerald, W., Mason, R. P., & Vandal, G. M. (1991). Atmospheric cycling and air-water exchange of mercury over mid-continental lacustrine regions. *Water Air and Soil Pollution*, 56(1), 745-767.
- Forbes, E. A., Posner, A. M., & Quirk, J. P. (1974). The specific adsorption of inorganic Hg(II) species and Co(III) complex ions on Goethite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 49, 403-409.
- Frankenberger, W. T. (2002). *Environmental chemistry of arsenic*. New York: Marcel Dekker.
- Furukawa, K., Suzuki, T., & Tonomura, K. (1969). Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria. *Agricultural and Biology Chemistry*, 33, 128-130.
- Gabriel, M. C., & Williamson, D. G. (2004). Principal Biogeochemical Factors Affecting the Speciation and Transport of Mercury Through the Terrestrial Environment. *Environmental Geochemistry and Health*, 26(4), 421-434.
- Gilmour, C. C., & Henry, E. A. (1991). Mercury Methylation in Aquatic Systems Affected by Acid Deposition. *Environmental Pollution*, 71(2-4), 131-169.

- Gilmour, J. T., & Miller, M. S. (1973). Fate of mercuri-mercurous chloride fungicide added to turfgrass. *Journal of Environmental Quality*, 2, 145-148.
- Girouard, É., & Zagury, G. J. (2008). Arsenic bioaccessibility in CCA-contaminated soils Influence of soil properties, arsenic fractionation and particle-size fraction. *Science of the Total Environment*, In Press, Corrected Proof.
- Goldman, L. R., & Shannon, M. W. (2001). Technical report: Mercury in the environment: Implications for pediatricians. *Pediatrics*, 108(1), 197-205.
- Hesterberg, D., Chou, J. W., Hutchison, K. J., & Sayers, D. E. (2001). Bonding of Hg(II) to Reduced Organic, Sulfur in Humic Acid as Affected by S/Hg Ratio. *Environmental Science & Technology*, 35(13), 2741-2745.
- Hissler, C., & Probst, J. L. (2006). Impact of Mercury Atmospheric Deposition on Soils and Streams in a Mountainous Catchment (Vosges, France) Polluted by Chlor-Alkali Industrial Activity: the Important Trapping Role of the Organic Matter. *Science of the Total Environment*, 361(1-3), 163-178.
- Hrudey, S. E., Chen, W., & Rousseaux, C. G. (1996). *Bioavailability in Environmental Risk Assessment*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- HSDB. (1998). Mercuric chloride. *Hazardous Substances Data Bank* Retrieved December, 2007, from <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>
- Jackson, T. A. (1998). Mercury in the aquatic ecosystems. In W. J. Langston & M. J. Bebianno (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments* (pp. 76-157). London: Chapman and Hall Publishers.
- Johansson, K., Aastrup, M., Andersson, A., Bringmark, L., & Iverfeldt, A. (1991). Mercury in Swedish forest soils and water-assessment of critical load. *Water Air and Soil Pollution*, 56, 267-281.
- Jonasson, I. R., & Boyle, R. W. (1971). *Geochemistry of mercury*. Paper presented at the Spatial Symposium on Mercury in Man's Environment.
- Kelley, M. E., Brauning, S. E., Schoof, R. A., & Ruby, M. V. (2002). *Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil*. Columbus: Battelle Press.

- Kim, K. H., Hansom, P. J., Barnett, M. O., & Lindberg, S. E. (1997). Biogeochemistry of mercury in the air-soil-plant system. In A. Sigel & H. Sigel (Eds.), *Metals Ions in Biological Systems*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc.
- Kimura, Y., & Miller, V. L. (1964). The degradation of organomercury fungicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 253-257.
- Lide, D. R. (1998). *Handbook of chemistry and physics*. New York, NY: CRC Press.
- Lindberg, S. E. (1987). Emission and deposition of atmospheric mercury vapor. In T. C. Hutchison & K. M. Meema (Eds.), *Lead, Mercury, Cadmium, and Arsenic in the Environment*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Lindqvist, O., Johansson, K., Bringmark, L., Timm, B., Aastrup, M., Andersson, A., et al. (1991). Mercury in the Swedish environment — Recent research on causes, consequences and corrective methods. *Water Air and Soil Pollution*, 55(1), xi-261.
- Ljung, K., Selinus, O., & Otabbong, E. (2006). Metals in soils of children's urban environments in the small northern European city of Uppsala. *Science of the Total Environment*, 366(2-3), 749-759.
- Neculita, C.-M., Zagury, G. J., & Deschênes, L. (2005). Mercury Speciation in highly Contaminated Soils from Chlor-Alkali Plants Using Chemical Extractions. *Journal of Environmental Quality*, 34, 255-262.
- Nusslein, F., Feicht, E. A., Schulte-Hostede, S., Seltmann, U., & Kettrup, A. (1995). Exposure analysis of the inhabitants living in the neighbourhood of a mercury-contaminated industrial site. *Chemosphere*, 30(12), 2241-2248.
- OMS. (2000). *Air Quality Guidelines for Europe* (2nd ed.). Copenhagen.
- OMS. (2004). *Guidelines for drinking-water quality* (3rd ed.). Geneva.
- Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., et al. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science & Technology*, 36(15), 3326-3334.

- Pacyna, E. G., Pacyna, J. M., Steenhuisen, F., & Wilson, S. (2006). Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmospheric Environment*, 40(22), 4048-4063.
- Paustenbach, D. J., Bruce, G. M., & Chrostowski, P. (1997). Current Views on the Oral Bioavailability of Inorganic Mercury in Soil: Implications for Health Risk Assessments. *Risk Analysis*, 17(5), 533-544.
- Pichard. (2006). *Mercury et ses dérivés*: INERIS.
- Pouschat, P., & Zagury, G. J. (2006). In Vitro Gastrointestinal Bioavailability of Arsenic in Soils Collected Near Cca-Treated Utility Poles. *Environmental Science & Technology*, 40(13), 4317-4323.
- Ravichandran, M. (2004). Interactions Between Mercury and Dissolved Organic Matter - a Review. *Chemosphere*, 55(3), 319-331.
- Ravichandran, M., Ryan, J. N., Aiken, G. R., & Reddy, M. M. (1998). Enhanced dissolution of cinnabar (mercuric sulfide) by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. *Environmental Science & Technology*, 32(21), 3305-3311.
- Revis, N. W., Osborne, T. R., Holdsworth, G., & Hadden, C. (1990). Mercury in Soil - a Method for Assessing Acceptable Limits. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19(2), 221-226.
- Rodriguez, R. R., Basta, N. T., Casteel, S. W., & Pace, L. W. (1999). An in Vitro Gastrointestinal Method to Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environmental Science & Technology*, 33(4), 642-649.
- Rogers, R. D. (1976). Methylation of mercury in agricultural soils. *Journal of Environmental Quality*, 5(4), 454-458.
- Ruby, M. V. (2004). Bioavailability of soil-borne chemicals: Abiotic assessment tools. *Human and Ecological Risk Assessment*, 10(4), 647-656.
- Ruby, M. V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., et al. (1999). Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science & Technology*, 33(21), 3697-3705.

- Rytuba, J. J. (2003). Mercury From Mineral Deposits and Potential Environmental Impact. *Environmental Geology*, 43(3), 326-338.
- Santé-Canada. (2008). Concentration de mercure dans le poisson. Retrieved 07-05, 2008, from [http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/\\_2002/2002\\_41-fra.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/_2002/2002_41-fra.php)
- Schluter, K. (2000). Review: evaporation of mercury from soils. An integration and synthesis of current knowledge. *Environmental Geology*, 39, 249-271.
- Schoof, R. A. (2004). Bioavailability of soil-borne chemicals: Method development and validation. *Human and Ecological Risk Assessment*, 10(4), 637-646.
- Schoof, R. A., & Nielsen, J. B. (1997). Evaluation of Methods for Assessing the Oral Bioavailability of Inorganic Mercury in Soil. *Risk Analysis*, 17(5), 545-555.
- Schroder, J. L., Basta, N. T., Casteel, S. W., Evans, T. J., Payton, M. E., & Si, J. (2004). Validation of the In Vitro Gastrointestinal (IVG) Method to Estimate Relative Bioavailable Lead in Contaminated Soils. *J Environ Qual*, 33(2), 513-521.
- Schroeder, W. H., Munthe, J., & Lindqvist, O. (1989). Cycling of mercury between water, air, and soil compartments of the environment. *Water Air and Soil Pollution*, 48(3), 337-347.
- Schuster, E. (1991). The Behavior of Mercury in the Soil With Special Emphasis on Complexation and Adsorption Processes - a Review of the Literature. *Water Air and Soil Pollution*, 56, 667-680.
- Selin, N. E., Jacob, D. J., Yantosca, R. M., Strode, S., Jaegle, L., & Sunderland, E. M. (2008). Global 3-D land-ocean-atmosphere model for mercury: Present-day versus preindustrial cycles and anthropogenic enrichment factors for deposition. *Global Biogeochemical Cycles*, 22(2), 13.
- Sheppard, S. C., Evenden, W. G., & Schwatz, W. J. (1995). Ingested Soil - Bioavailability of Sorbed Lead, Cadmium, Cesium, Iodine, and Mercury. *Journal of Environmental Quality*, 24(3), 498-505.
- Steffen, A., Douglas, T., Amyot, M., Ariya, P., Aspmo, K., Berg, T., et al. (2008). A synthesis of atmospheric mercury depletion event chemistry in the atmosphere and snow. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 8(6), 1445-1482.

- Stein, E. D., Cohen, Y., & Winer, A. M. (1996). Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Critical reviews in environmental science and technology*, 26(1), 1-43.
- Stock, V. A., & Cucuel, F. (1934). Die Verbreitung des Quecksilbers. *Die Naturwissenschaften*, 1(6), 390-393.
- Stortedler, P. B. M., Van der Gaag, M. A., & Van der Kooy, L. A. (1989). *Perspectives for water organisms (part 1 and 2)*. Leystad.
- Thomassin, J. F., & Touze, S. (2003). *Le mercure et ses composés, comportement dans les sols, les eaux et les boues de sédiments*: BRGM.
- Ullmann. (1990). Magnetic Materials to Mutagenic Agents: mercury. In S. H. a. G. Schulz (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (5th Ed. ed., pp. 269-298). New York, NY: VCH. B. Elvers.
- USDHHS. (1999). *Toxicological Profile for Mercury*. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- USEPA. (1992). Dermal exposure assessment: principles and applications. *Guide US EPA*, June, from <http://www.epa.gov>
- USEPA. (1995, Jan 25, 2007). Mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) (CASRN 7487-94-7). *Integrated Risk Information System* Retrieved June, 2007, from <http://www.epa.gov/iris/subst/0692.htm>
- USEPA. (1996). Soil Screening Guidance: Technical Background Document. *Office of Solid Waste and Emergency Response* Retrieved June, 2007, from <http://www.epa.gov/>
- USEPA. (1997, May 02, 2007). Volume IV: An Assessment of Exposure to Mercury in the United States. *Mercury Study Report To Congress* Retrieved June, 2007, from <http://www.epa.gov/mercury/report.htm>
- USEPA. (2001). Fish tissue criterion for methylmercury to protect human health document. *Water Quality Criteria* Retrieved June, 2007, from <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/methylmercury/document.html>

- USEPA. (2006, June 13, 2007). Child-Specific Exposure Factors Handbook (External Review Draft). *National Center for Environmental Assessment, NCEA* Retrieved June, 2007, from <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?deid=56747>
- USEPA. (2007, April 18, 2007). Framework for Metals Risk Assessment. *National Center for Environmental Assessment, NCEA* Retrieved July, 2007, from <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?deid=167607>
- Wallschlager, D., Desai, M. V. M., Spengler, M., Windmoller, C. C., & Wilken, R. D. (1998). How Humic Substances Dominate Mercury Geochemistry in Contaminated Floodplain Soils and Sediments. *Journal of Environmental Quality*, 27(5), 1044-1054.
- Waples, J. S., Nagy, K. L., Aiken, G. R., & Ryan, J. N. (2005). Dissolution of cinnabar (HgS) in the presence of natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(6), 1575-1588.
- Weldon, M. M., Smolinski, M. S., Maroufi, A., Hasty, B. W., Gilliss, D. L., Boulanger, L. L., et al. (2000). Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. *Western Journal of Medicine*, 173(1), 15-18.
- WHO-IPCS. (1976). Environment Health Criteria n°1: Mercury. Retrieved February, 2008, from <http://www.inchem.org/fullist.htm>
- Yamada, M., & Tonomura, K. (1972). Formation of methylmercury compounds from inorganic mercury by *Clostridium cochlearum*. *Journal of Fermentation Technologies*, 50, 159-166.
- Yin, Y. J., Allen, H. E., Huang, C. P., & Sanders, P. F. (1997). Adsorption/Desorption Isotherms of Hg(II) by Soil. *Soil Science*, 162(1), 35-45.
- Yin, Y. J., Allen, H. E., Li, Y. M., Huang, C. P., & Sanders, P. F. (1996). Adsorption of Mercury(II) by Soil: Effects of Ph, Chloride, and Organic Matter. *Journal of Environmental Quality*, 25(4), 837-844.
- Zagury, G. J. (2007). Comments on "Effect of soil properties on arsenic fractionation and bioaccessibility in cattle and sheep dipping vat sites" by D. Sarkar et al. (2007) *Environment International* 33 (2007) 164-169. *Environment International*, 33(5), 712-713.

- Zagury, G. J., Bedeaux, C., & Welfringer, B. (2008). Influence of mercury speciation and fractionation on bioaccessibility in soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *In Press*, *Corrected Proof*.
- Zagury, G. J., Neculita, C.-M., Bastien, C., & Deschênes, L. (2006). Mercury fractionation, bioavailability, and ecotoxicity in highly contaminated soils from chlor-alkali plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(4), 1138-1147.



## ANNEXES

### **Annexe 1 – Description des méthodes in vitro CDM, IVG et SBRC**

#### ***1. Méthode CDM***

Barnett et al. (2001) décrivent la méthode CDM mise au point pour déterminer la bioaccessibilité du mercure dans un échantillon de sol donné. Cette méthode se déroule en deux phases, avec tout d'abord une phase stomacale, suivie d'une phase intestinale. 0.37 g de sol, préalablement tamisé à 250 µm, est placé dans un erlenmeyer contenant 500 ml d'eau déionisée et désaérée ajustée à un pH de 2.5 grâce à de l'acide chlorhydrique.

Les échantillons sont ensuite agités continuellement à 30 rpm à température ambiante (21°C). Le pH est contrôlé au bout de 10, 30 et 60 minutes et éventuellement réajusté. Au bout de quatre heures d'agitation, le pH est noté et l'échantillon est mis au repos pour 25 minutes. 50 ml de surnageant sont ensuite prélevés, filtrés à 0.45 µm et envoyés pour analyse (méthode SW-846 7470) dans du dichromate de potassium agissant comme conservateur. Cette première phase simule le passage du sol à travers l'estomac. Ensuite 50 ml d'eau déionisée sont ajoutés pour rétablir le ratio initial sol/liquide. Le pH est ajusté à 6.5 en ajoutant de l'hydroxyde de sodium. L'agitation à 30 rpm est remise en marche et le pH est contrôlé et éventuellement réajusté au bout de 10, 30 ou 60 minutes. Au bout de quatre heures, le pH des échantillons est noté avant que 50 ml de surnageant soient prélevés par la même méthode décrite précédemment. Cette seconde phase simule le passage du sol à travers l'intestin.



**Figure 6.1 - Montage de la méthode CDM**

## **2. Méthode IVG**

La méthode IVG (in vitro gastro-intestinale) a été développée par Rodriguez et al. (1999) dans le cadre de travaux sur la bioaccessibilité de l'arsenic. Dans son article, l'équipe a comparé plusieurs méthodes IVG qui diffèrent seulement par quelques composants. Les procédures des différentes méthodes sont les mêmes et consistent à utiliser des récipients de 1 l en verre comme réacteurs, à maintenir une température constante de 37°C pour simuler la température interne du corps humain, à maintenir un flux constant d'argon pour simuler les conditions anaérobies, et à maintenir une agitation constante de 100 rpm pour simuler le mixage gastrique. Par ailleurs, le pH est constamment contrôlé pour être ajusté à la phase d'expérimentation.

Comme dans la méthode CDM, la procédure est partagée en deux étapes, une phase gastrique à un pH faible, suivie d'une phase intestinale à un pH faiblement acide. La diminution de pH se fait par ajout de HCl et l'augmentation de pH par ajout de NaHCO<sub>3</sub>. Un adjuvant anti-mousse a été rajouté durant les deux phases afin de prévenir la

formation de la mousse due à la diffusion constante d'argon dans la solution. 4 g de sol ( $< 250 \mu\text{m}$ ) est mélangé à 600 ml de solution gastrique. Après une heure de chaque phase, un échantillon de 40 ml de solution est prélevé puis est centrifugé à 10000 rpm pendant 15 minutes. Le liquide surnageant est ensuite récupéré puis filtré à travers un filtre de  $0,45 \mu\text{m}$  acidifié à pH 2, avant d'être analysé.

#### (1) Méthode in vitro gastro-intestinale (IVG)

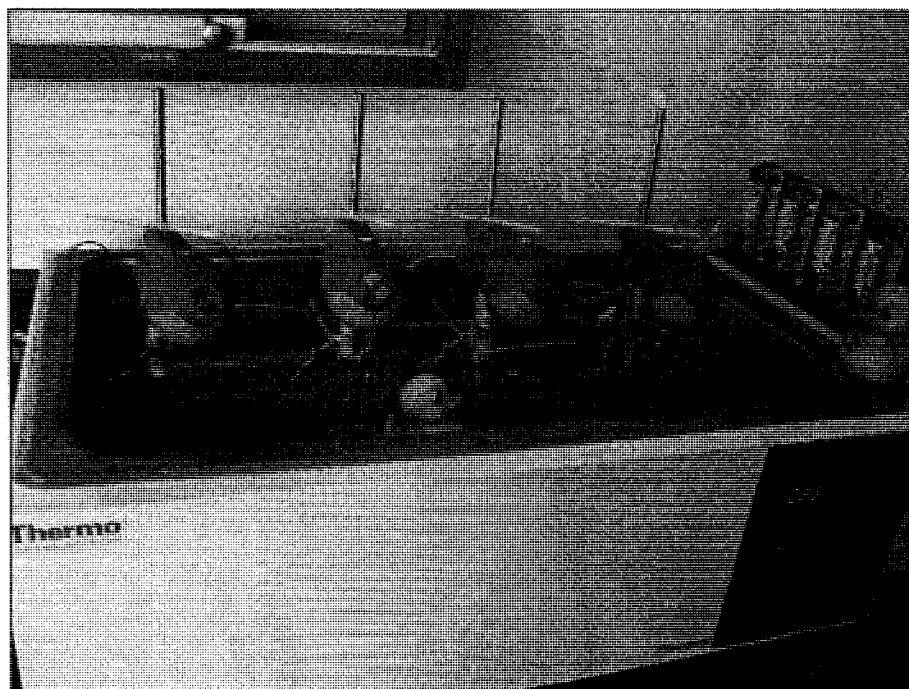
Pour cette procédure, la phase gastrique est simulée par une solution de 0,15 M de NaCl plus 1 % de pepsine de porc (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, cat. No. 146518). Quatre grammes de sols sont ensuite ajoutés à 600 ml de solution gastrique avec 200 grammes de pâte sensés représenter la nourriture ingérée. Puis le pH de la solution est ajusté à 1,8. Ensuite, la phase intestinale est obtenue à partir de la phase gastrique en ajustant le pH à 5,5 avec une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . On ajoute ensuite 2,10 g d'extrait de bile de porc (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, cat. No. B8631) et 0,21 g de pancréatine de porc (Cat. No. P1500).

#### (2) Méthode in vitro gastro-intestinale avec adsorption (IVG-AB)

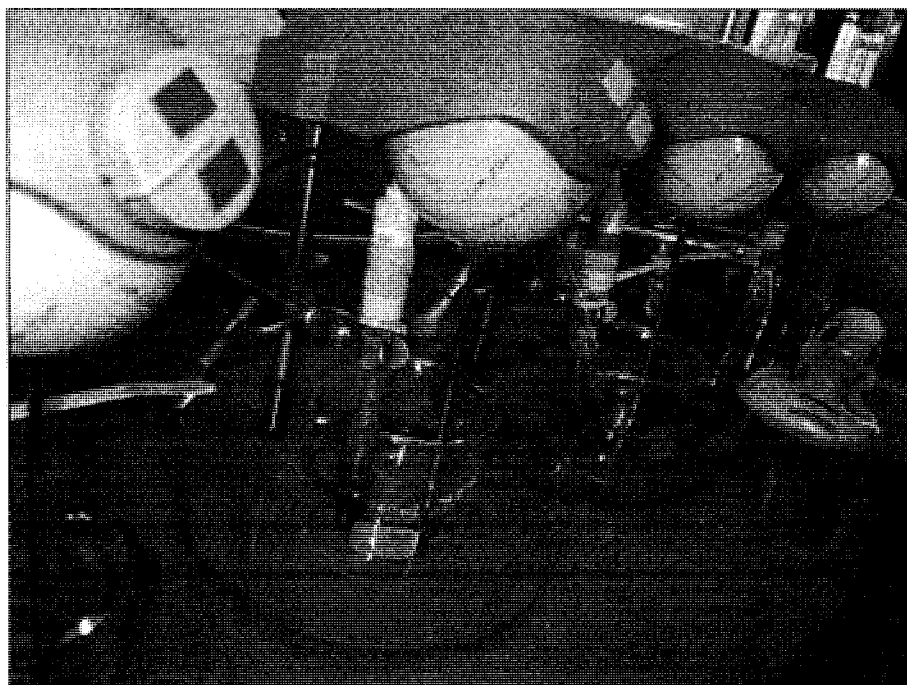
Cette seconde procédure est réalisée pour voir si l'on peut simuler une étape d'absorption par des aliments des contaminants dans l'intestin. La méthode est exactement la même que décrite précédemment dans la méthode IVG, avec pour seule différence l'ajout, lors de la phase intestinale, d'un gel d'hydroxyde de fer amorphe fraîchement préparé. Ce gel sert d'adsorbant durant la phase intestinale en trempant entièrement dans la solution. À la fin de la phase, le gel est placé dans un erlenmeyer pour dessorber le contaminant.

#### (3) Méthode IVG de Pouschat et Zagury (2006)

Pouschat et Zagury ont décrit en 2006 leur procédure IVG, qui ne diffère de la méthode IVG (1) que sur quelques points. Aucune pâte n'est ajoutée pour simuler la nourriture ingérée et les volumes des solutions et des ajouts sont moins importants, mais restent égaux en concentration et le ratio solide/liquide est conservé.



**Figure 6.2 - Montage de la méthode IVG**



**Figure 6.3 - Disposition des instruments utilisés pour la méthode IVG**

### **3. Méthode SBRC**

Le principe de la méthode SBRC (Kelley *et al.*, 2002) est le même que les deux précédentes, à savoir simuler le passage d'un sol à travers l'estomac puis l'intestin d'un enfant. Toute l'expérience se déroule dans un bain d'eau à 37°C. Le fluide d'extraction est une solution de 1,9 l d'eau déionisée à laquelle on a ajouté 60,06 g de glycine. Ensuite, on abaisse le pH de cette solution à 1,5 à l'aide de HCl concentré. Puis on ajuste le volume de la solution à 2 l afin d'avoir une concentration en glycine de 0,4 M.

On place ensuite dans dix échantillons 100 ml du fluide d'extraction plus 1 g de sol contaminé. Les échantillons sont ensuite agités à 30 rpm pendant une heure pour simuler la phase gastrique. À la fin de la première phase, on collecte 5 mL de solution que l'on conserve avec de l'acide nitrique pour analyse.

La phase intestinale débute lorsque l'on a rajouté du NaOH pour monter le pH à 7 ainsi que 175 mg de bile et 50 mg de pancréatine. La durée pour la phase intestinale est ensuite de 4 heures. Finalement on filtre 15 ml de la solution avec un filtre de 0,45 µm. Avant l'analyse, il faut stocker tous les échantillons à une température de 15°C.

## **Annexe 2 – Article soumis en tant que co-auteur**

### **1. Title**

Influence of mercury speciation and fractionation on bioaccessibility in soils

### **2. Author and co-authors**

Gérald J. Zagury, Christophe Bedeaux, and Bruno Welfringer

Department of Civil, Geological and Mining Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

### **3. Abstract**

Ingestion of contaminated soils by children during hand to mouth activities can be a significant exposure pathway to toxic chemicals. Bioaccessibility, which corresponds to the fraction of an ingested contaminant dissolved in the gastro-intestinal tract and potentially available for absorption, can be determined by *in vitro* extractions and give a conservative value of relative oral bioavailability. The goal of this study was to investigate the validity of the CDM *in vitro* extraction protocol, developed by Camp Dresser and Mc Kee, by assessing the influence of soil properties and Hg fractionation on bioaccessibility. Mercury bioaccessibility was determined in two pure mercury compounds, two reference materials (a soil and a sediment), and three field-collected contaminated soils. Soils and reference materials were characterized and a sequential extraction procedure was applied to the samples. Bioaccessibility of  $\text{HgCl}_2$  was 99.8% in the gastric phase and 88.6% in the intestinal phase, whereas bioaccessibility of  $\text{HgS}$  was lower than 0.01%. In field-collected soils A, B, M and, in ERM<sup>®</sup>- CC580, mercury bioaccessibility was lower than 3.2 % (below detection). In contrast, CRM 025-050 had a high Hg bioaccessibility (44.3% for gastric phase and 34.7% for intestinal phase). Gastric and intestinal bioaccessibility values were positively correlated with sulfate content in soils ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$  for both gastric and intestinal bioaccessibility). In

field-collected soils and ERM<sup>®</sup>- CC580, the residual fraction represented near 100% of the mercury recovered, with less than 2% of mercury being in the water soluble (F1) and CaCl<sub>2</sub>-exchangeable (F2) fractions. In contrast, 46% of mercury in the reference material CRM 025-050 was extracted in the CaCl<sub>2</sub>-exchangeable fraction. Results of the sequential extractions were in agreement with bioaccessibility values, with the sum of the water-soluble and CaCl<sub>2</sub>-exchangeable fractions (F1+F2) highly correlated with intestinal bioaccessibility values ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ). Hence, the sequential extraction procedure used in this study could be a simple means to help validate mercury bioaccessibility.

**Keywords:** mercury; in vitro oral bioavailability; bioaccessibility; soils; reference materials; fractionation; speciation.

#### **4. Introduction**

Ingestion of contaminated soils by young children during hand to mouth activities can be a significant exposure pathway to toxic chemicals (Revis NW et al. 1990, Paustenbach et al. 1997, U.S. EPA 1997, Pouschat and Zagury 2006). In an exposure assessment to mercury of inhabitants near an Hg-contaminated site, children between 1 and 4 years old were more at risk regarding intoxication with mercury than other groups of age. In this study, soil ingestion was the major exposure pathway, before consumption of garden vegetables and inhalation of mercury (Nußlein et al. 1995). A speciation study of mercury present at a site is needed prior to conducting any bioavailability studies (Kelley et al. 2002). If elemental mercury (Hg<sup>0</sup>) is present in high concentrations at a site, the relative importance of the inhalation exposure is likely to outweigh the oral exposure route. Moreover, elemental mercury's absorption through the gastro intestinal tract is very low ( $\leq 0.01\%$ ) (USEPA 1997, Counter and Buchanan 2004). Even though absorption of methyl mercury through the gastro intestinal tract is supposed to be almost complete (Canady et al. 1997), methyl Hg is generally a minor fraction in contaminated soils and not a significant risk in the soil ingestion exposure pathway (Barnett and

Turner 2001). On the contrary, ingestion of inorganic Hg in soil by children can be a significant exposure pathway (U.S Department of Energy 1994). Once ingested, the main target of divalent mercury is kidneys and toxicity is caused by its bonding property to sulphur containing groups, like thiols, presents in critical enzymes and some protein structures.

Reference doses for ingestion are only available for methyl mercury and mercuric chloride but not for mercury-contaminated soils. Consequently, soil remediation goals calculated using absorption factors of pure mercury compounds might lead to an overestimation of risks and cleaning costs (Davis et al. 1997, Paustenbach et al. 1997).

The exposure to a contaminant is controlled by its bioavailability, the fraction of an ingested compound that reaches the systemic circulation. Bioaccessibility refers to the fraction of this compound desorbed from the soil and dissolved in the gastrointestinal tract (Davis et al. 1997, Schoof and Nielsen 1997, U.S. EPA 2007). To our knowledge, only one in vivo study has attempted to estimate the oral bioavailability of native mercury in soil (Revis N et al. 1989a, Revis NW et al. 1990). Unfortunately, this study using adult mice was not able to provide a reliable estimate of relative bioavailability because of study design limitations (Paustenbach et al. 1997, Kelley et al. 2002). Most other in vivo mercury bioavailability studies were performed using pure mercury compounds, like mercuric chloride or mercury nitrate, added to milk, water, or food. Many review papers about bioavailability and bioaccessibility of mercury in soil stress the need to develop a cost-effective protocol to estimate bioavailability of mercury in soils (Canady et al. 1997, Schoof and Nielsen 1997). In the absence of reliable in vivo data, in vitro estimates of bioaccessibility can be good surrogates for setting risk based remediation goals, as they can provide conservative estimates of the relative oral bioavailability (Schoof and Nielsen 1997). The most relevant study of mercury bioaccessibility in contaminated soils was conducted with floodplain soils from the East Fork of Poplar Creek (EFPC) in Oak Ridge, TN (Barnett and Turner 2001). This study used an in vitro extraction protocol (CDM method) previously used by Camp Dresser and Mc Kee Inc. (1992) in a risk assessment at another contaminated site. The average



mercury bioaccessibility in the 20 soil samples from the EFPC in Oak Ridge was about 5 %, whereas the bioaccessibility of mercuric chloride was 100 % and less than 1% for mercuric sulphide (cinnabar and metacinnabar) (Barnett and Turner, 2001). In different soil samples collected at the same site, mercury was predominantly found in the inorganic form and mercury sulphide and elemental mercury were the dominant species presents in soils (Revis NW et al. 1989b, 1990, Barnett et al. 1995).

In vitro assays that simulate gastrointestinal conditions can be used to estimate bioaccessibility of metals in contaminated soils (Ruby, 2004; Pouschat and Zagury, 2006; 2007). However, in vitro methods should ideally be validated with in vivo studies using an appropriate animal model (Zagury, 2007). Schoof and Nielsen (1997) and Kelley et al (2002) provide a frame work for researchers interested in designing site specific in vivo studies for mercury oral bioavailability. In the absence of in vivo data, in vitro studies can partially be validated by studying the mercury binding forms in soils and by testing pure mercury compounds, and certified reference materials.

The objective of this study is to further investigate the soundness of the in vitro gastrointestinal protocol (CDM method) used for the EFPC site (Barnett and Turner 2001), and to assess the influence of mercury speciation and fractionation on bioaccessibility. Bioaccessibility of mercury in two pure mercury compounds ( $\text{HgCl}_2$  and  $\text{HgS}$ ) was determined, and the results were compared to those previously published (Barnett and Turner 2001). Hg bioaccessibility was then assessed in pure mercuric chloride dispersed in kaolin, in two certified reference materials (CRM 025-050 and ERM®- CC580) and in three field-collected soils. The influence of soil properties on Hg bioaccessibility was investigated, and finally, a recently developed and validated sequential extraction procedure (Neculita et al. 2005) has been applied to the two reference materials, and to the three surface soils to link Hg fractionation with bioaccessibility.

## **5. *Material and methods***

### **Samples**

Two pure mercury compounds (mercuric chloride and mercuric sulphide), one sample prepared by mixing mercuric chloride with kaolin, two certified reference materials (CRM 025-050 and ERM®- CC580), two surface soils (A and B) collected near a chlor-alkali plant in Eastern Canada and one soil collected near a gold mine in Quebec (soil M) were tested for mercury bioaccessibility. ERM®- CC580 is a sediment sample and CRM 025-050 is a certified soil sample originating from a contaminated site located in the Western United States.

Pure mercury compounds, mercuric chloride mixed with kaolin (see Neculita et al. 2005 for details), and the certified reference materials were used without pre-treatment. Surface soils A, B, and M were air dried at room temperature, slightly crushed to segregate soils particles and sieved to <2 mm. Then, a fraction of each soil was sieved to <250 µm. Soils samples A, B, and M were stored in HDPE containers at 4°C, and certified reference materials were kept in their original container at 4°C before utilization.

### **Soil characterization**

Surface soils A, B, M (sieved to <2 mm), and the certified reference materials were characterized for pH, water content, total sulphur, sulphate content, total carbon, total organic carbon, and particle-size distribution. The pH was measured in deionised water using a solid to liquid ratio of 1:2 according to the method of the Canadian Society of Soil Science (Carter 1993), with a pH combination electrode with Single-Junction Ag/AgCl reference (Accumet 13-620-285). Moisture content was determined at 45°C to minimize Hg volatilization during drying (Maserti and Ferrara 1991, Sakamoto 1995). Total carbon and total sulphur were measured by high temperature combustion with an induction furnace (LECO, St. Joseph, MI). Total organic carbon was analyzed after treatment with phosphoric acid according to Standard Method 5310B (Clesceri et al.

1999). Total inorganic carbon was calculated by the difference between total carbon and total organic carbon. Sulphate content was measured by spectrophotometry following an HCl digestion according to method EPA-600/2-78-054 (Sobek et al. 1978). Particle size analysis of bulk surface soils was performed according to ASTM Method D422-63 (American Society for Testing Materials 2002). Surface soils were classified as clay ( $<2\text{ }\mu\text{m}$ ), silt ( $2\text{ }\mu\text{m} - 50\text{ }\mu\text{m}$ ), sand ( $50\text{ }\mu\text{m} - 2\text{ mm}$ ) and gravel ( $>2\text{ mm}$ ) according to the USDA soil survey manual (Soil Survey Division Staff 1993).

### **Total mercury**

Total concentration of Hg in soils was determined following an acid digestion scheme (Akagi and Nishimura 1991, Neculita et al. 2005). One gram of sample ( $1.000 \pm 0.005\text{ g}$ ) was weighed and placed in a 100 ml volumetric flask and 2 ml of  $\text{HNO}_3$ , 10 ml of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and 2 ml of  $\text{HClO}_4$  were added. For ERM®-CC580, only 0.5 g of material was used for total Hg determination. The digestion was performed at  $250^\circ\text{C}$  on a hot plate (Corning [Corning, NY] PC 320 model) for 1 h, and allowed to cool at room temperature. The digest was filtered ( $0.45\text{ }\mu\text{m}$ ) and diluted with deionized water to 100 ml. Total Hg was measured by cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) according to method MA. 200 - Hg 1.0 (CEAEQ 1997). The detection limit for Hg in the liquid phase was  $0.1\text{ }\mu\text{g/l}$ .

Accuracy and precision of the digestion procedure for total Hg analysis were also verified in triplicate using the certified reference material ERM®-CC580 and soil CRM 025-050. The reference values are 132 mg/kg with an uncertainty of 3 mg/kg for ERM®-CC580 (half-width of the 95% confidence interval of the mean) and  $99.8 \pm 31.7\text{ mg/kg}$  for CRM 025-050. The mean concentrations measured in this study were  $111.0 \pm 7.3\text{ mg/kg}$  and  $83.5 \pm 8.3\text{ mg/kg}$  for ERM®-CC580 and CRM 025-050 respectively. These concentrations are consistent with the certified values.

### Bioaccessibility of mercury in soils

Mercury bioaccessibility was determined in triplicates using the CDM method (Barnett and Turner 2001). Briefly,  $0.370 \pm 0.005$  g of sample ( $<250 \mu\text{m}$  for surface soil samples) was added in a 1 l Erlenmeyer to 0.5 l of deionized water previously adjusted to pH 2.5 with HCl and purged for 3 minutes with nitrogen. For the gastric phase (4 hours), samples were shaken for 10 minutes at 125 rpm on a rotary shaker and the pH was re-adjusted. Then, the solution was stirred continuously at 30 rpm until the end of the gastric phase, while pH was re-adjusted to  $2.5 \pm 0.1$  after 30 and 60 minutes if needed. Shaking was then stopped for 25 minutes to allow settling of samples and 50 ml were collected for mercury analysis. For the intestinal phase (4 hours), 50 ml of deionized water was first added to the solution and the pH was adjusted to  $\text{pH } 6.5 \pm 0.2$  by NaOH, and re-adjusted after 10, 30 and 60 minutes. The samples were then continuously shaken at 30 rpm until the end of the intestinal phase. Shaking was again stopped during 25 minutes and 50 ml were collected for mercury analysis.

### Bioaccessibility and exposure calculations

Mercury bioaccessibility in gastric and intestinal solutions was calculated by dividing the mercury concentration (mg/kg) measured in the in vitro gastric solution and in the in vitro intestinal solution by the total mercury concentration in soil (mg/kg) as described by equations 1 and 2. For intestinal bioaccessibility calculation, mercury concentration of the in vitro intestinal solution takes into account the amount of mercury removed at the end of the gastric phase.

$$\% \text{CDM G} = \frac{\text{Hg}_G}{\text{Hg}_{\text{soil}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{CDM I} = \frac{\text{Hg}_I}{\text{Hg}_{\text{soil}}} \times 100 \quad (2)$$

With:

%CDM G and %CDM I = bioaccessible fractions of mercury at the end of gastric and intestinal phase respectively;

Hg<sub>soil</sub> = total mercury concentration in soil  $<250 \mu\text{m}$  (mg/kg);

Hg G and Hg I = mercury concentration (mg/kg) calculated from the values measured ( $\mu\text{g/L}$ ) in the in vitro gastric solution and in the in vitro intestinal solution respectively.

### **Sequential extraction procedure**

The sequential extraction procedure was performed according to a validated method used for chlor-alkali contaminated soils (Neculita et al. 2005). Mercury was separated into fractions defined as water-soluble (F1),  $\text{CaCl}_2$ -exchangeable (F2), organic (F3), and residual (F4). The sequential extractions were performed using  $2.000 \pm 0.005$  g of weighed soil sample mixed with 20 ml of solvent in a 50 ml polypropylene centrifuge tube. The tubes were thoroughly shaken for 2 h at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  using a mechanical wrist-action shaker. Between each of the successive extractions and rinses, the supernatant was obtained by centrifuging at 12000 g (10,000 rpm) for 15 to 25 min at  $10^\circ\text{C}$ . Rinsing steps consisted of washing the leached residues twice with deionized water (20 and 10 ml) for 15 min. The rinses were then added to the solvent extract from the same sample. The combined supernatant was analyzed for Hg by CVAAS. The solid residue was used in the next extraction step. The water-soluble fraction was extracted with deionized water, whereas exchangeable Hg was extracted under slightly acidic conditions ( $\text{pH} = 5$ ) with 1 M  $\text{CaCl}_2$ . The organic fraction was separated by successive extractions using 0.2 M NaOH and 4%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (v/v). The remaining Hg, considered as residual Hg (F4), was obtained by adding the same reagents as for total Hg determination. Residual Hg in digest and Hg concentrations in extracts were analyzed by CVAAS. All reagents were ACS grade or better.

### **Statistical analyses**

In order to investigate the relationships between soil properties, mercury fractionation, and bioaccessibility, a correlation matrix and a principal components analysis (PCA) were performed. For the PCA, the following variables were used: total mercury concentration (Hg tot), pH, total carbon (TC), total organic carbon (TOC), sulphate content (Sulf), percentage of fines ( $<80 \mu\text{m}$ ), intestinal bioaccessibility (%CDM I), and

sum of fractions F1 and F2 (%). The intestinal bioaccessibility (%CDM I) was used in the PCA because gastric (%CDM G) and intestinal bioaccessibility are dependant variables and Hg absorption occurs mainly in the intestinal tract (Rodriguez et al. 1999). The sum of fraction F1 and F2 was also included in the PCA because these fractions are the most likely to be bioaccessible. Even though the number of samples is limited, the PCA enables a visualization of the correlation between the tested variables. Statistical analyses were performed with the software Statistica version 7.

## **6. Results and discussion**

### **Soils characterization**

#### *Particle size distribution*

Based on the USDA classification system, the bulk surface soils A and B were classified as clays. Soil A contained 32% of clay, 15% of silt, 17% of sand, and 36% of gravel whereas soil B had 47% of clay, 21% of silt, 12.5% of sand, and 19.5% of gravel. Soil M (silty loam) contained 6% of clay, 68% of silt, 26% of sand and no gravel. According to the certificate of analysis (RTC 2006), CRM 025-050 is a sandy loam. This reference material contains only 19% of fine particles (<80  $\mu\text{m}$ ) whereas ERM<sup>®</sup>-CC580 contains 84% of fine particles.

#### *Total Hg and physicochemical properties*

The physicochemical properties of the three surface soils A, B, M, and the two reference materials are presented in **Table 1**. Mercury concentrations measured in the fraction <250  $\mu\text{m}$  were 15.2 mg/kg, 6.6 mg/kg and 4.3 mg/kg for soils A, B, and M respectively, whereas concentrations measured for the same soils in the fraction <2 mm were 14.1 mg/kg, 7.7 mg/kg and 2.6 mg/kg. These concentrations are higher than concentrations found in European urban parks (from 0.015 mg/kg up to 6.3 mg/kg) (Rodrigues et al. 2006) but lower than concentrations reported in other studies dealing with soil contamination by mercury emissions from chlor-alkali plants (Zagury et al. 2006). For example, Hg concentrations ranging from 4.3 mg/kg up to 1150 mg/kg were

reported in soils collected near a chlor-alkali plant (Bernaus et al. 2006) and a concentration as high as 11500 mg Hg/kg was reported in a mixture of contaminated alluvial deposits and solid wastes collected near a chlor-alkali plant (Neculita et al. 2005). The five study-samples were neutral to alkaline with a pH varying from 7.3 to 9.7. Total carbon in samples varied between 14 and 115 g/kg with the reference material ERM®-CC580 having the highest total carbon content. Moreover, organic carbon ranged between 2.0 and 37 g/kg. Soils A, B, and M had a low sulphur content (<2 g/kg), whereas CRM 025-050 had the highest. In this certified sample, nearly 75% of the total sulphur was present as sulphate. In summary, soil CRM 025-050 was different from the other samples with its high sulphur content and its coarser texture.

### **Bioaccessibility**

Mercury bioaccessibility results are presented in **Table 2**. For HgCl<sub>2</sub>, and CRM 025-050, intestinal bioaccessibility values (pH = 6.5) were lower than gastric bioaccessibility values (pH = 2.5). Bioaccessibility of the two pure mercury compounds, HgCl<sub>2</sub> and HgS, was in good agreement with the values reported in the study of EFPC soils (Barnett and Turner 2001). For HgCl<sub>2</sub>, gastric Hg bioaccessibility measured in this study was 99.7% compared to 98%, and intestinal bioaccessibility was 89% compared to 81-83%. For HgS, the maximum bioaccessibility value was lower than 0.01% in agreement with the value reported by (Barnett and Turner 2001). These results demonstrate the reproducibility of the CDM method when applied on pure mercury compounds. Moreover they are in agreement with the relative water solubility of these compounds. Water solubility of HgCl<sub>2</sub> is around 7 g/100 ml at 20°C-25°C (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1999, John 1999, David 2002-2003) whereas cinnabar or red mercuric (II) sulphide (HgS) is nearly insoluble in water ( $K_{sp} = 10^{-38.9}$  to  $10^{-36.7}$ ) (Benoit et al. 1999). Mercury bioaccessibility of kaolin spiked with HgCl<sub>2</sub> was very close to the bioaccessibility of the pure compound (Table 2). Mercury bioaccessibility of soils and reference materials can easily be separated in two groups: ERM®-CC580 and soils A, B, and M in one group (bioaccessibility of mercury lower than 3.2%), and soil

CRM 025-050 in the other group (gastric bioaccessibility of 44.3%, and 34.7% for the intestinal phase), which is more than ten times higher than the four former materials. This difference may result from the physicochemical properties of CRM 025-050. It must be remembered indeed that this reference soil sample is a sandy loam that exhibits the lowest proportion of fines (19%). As reported for other elements, bioaccessibility in soils is influenced by soil texture. For example, As bioaccessibility in chlor-alkali contaminated soils was negatively correlated with clay content ( $r^2 = 0.43$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) (Pouschat and Zagury 2006) and Cu bioaccessibility was negatively correlated with silt content ( $r^2 = 0.65$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ) (Pouschat and Zagury 2007). From these results and the results from EFPC field collected soil samples (Barnett and Turner, 2001) it can be observed that Hg bioaccessibility in field collected soils is seldom higher than 5%. The influence of soil properties on Hg bioaccessibility will be discussed further in the paper.

### **Mercury fractionation**

The sequential extractions were performed in triplicate for all samples except for ERM®-CC580 ( $n = 2$ ). During the sequential extraction procedure, an additional determination of total mercury was performed. As shown in **Table 3**, recoveries were satisfying (around 100%) and standard errors were low considering the volatility of some mercury species in soils. In soils A, B, M, and ERM®-CC580, mercury was mainly found in the residual fraction F4, while mercury in the other fractions was very low ( $\leq 1\%$ ). These results suggest a low mobility of mercury in these soils ( $F1 + F2 + F3 < 2.2\%$ ) in agreement with the low bioaccessibility measured with the CDM protocol. In contrast, for soil CRM 025-050, the  $\text{CaCl}_2$ -exchangeable Hg (F2) represented 45.8% of total mercury. Interestingly, this value is close to the gastric bioaccessibility of mercury (44.3%), confirming the relatively important solubility of mercury in this soil sample.



### **Influence of soil properties and mercury fractionation on bioaccessibility**

**Figure 1** shows a projection of selected variables on the factorial plane (1, 2) obtained following the principal component analysis. The two factors explained 88.3% of the total variation. The variables strongly correlated with factor 1 (54.5% of the total variation) were the proportion of fines (0.94), the intestinal bioaccessibility (-0.97), the sum of fractions F1 and F2 (-0.97), the total sulphate content (-0.98) and the pH (0.55). The figure shows that intestinal bioaccessibility (%CDM I) increases with the sum of fractions F1 and F2 (F1+F2) and the sulphate content but decreases with proportion of fines and pH. Variables strongly correlated with factor 2 were soil total mercury (-0.92), total organic carbon (-0.97), and total carbon content (-0.90). A multiple regression ( $r^2 = 0.97$ ,  $p < 0.03$ ,  $n = 5$ ) showed that total mercury in soils was strongly linked with total carbon and total sulphur content (equation 3).

$$\bullet \quad \text{Hg total} = B1 \times \text{TS} + B2 \times \text{TC} + I \quad (3)$$

With  $B1 = 7.22 \pm 1.25$ ,  $B2 = 0.89 \pm 1.14$ ,  $I = -18.07 \pm 9.30$

The only soil properties significantly correlated with bioaccessibility were total sulphur content ( $r = 0.97$ ,  $p < 0.01$  for %CDM G, and  $r = 0.96$ ,  $p < 0.01$  for %CDM I) and sulphate content ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$  for %CDM G, and  $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$  for %CDM I). This positive effect of sulphur content on Hg bioaccessibility was influenced by the soil CRM 025-050 which has both the highest sulphate content and mercury bioaccessibility. The presence of sulphur usually decreases mercury mobility, either by fixing mercury to organic matter (especially humic acids) or by trapping it in the form of mercuric (II) sulphide (Andersson 1979, Schuster 1991, Gabriel and Williamson 2004). However in this case, the increase or mercury bioaccessibility could be explained by the presence of mercuric sulphate ( $\text{HgSO}_4$ ), a soluble mercury complex. In a speciation study of mercury in soils contaminated by a chlor-alkali plant,  $\text{HgSO}_4$  was found to constitute up to 20% of the total mercury present in soils, along with  $\text{HgS}$ (cinnabar),  $\text{HgO}$  and corderoite (Bernaus et al. 2006). Additionally, in the presence of excess sulphide (the molar ratio of S/Hg is equal to 893 for CRM 025-050), mercuric (II)

sulphide can dissolve to form more soluble mercury complexes with sulphur, like  $\text{Hg}(\text{SH})_2^0$ ,  $\text{HgS}_2\text{H}^-$ ,  $\text{HgS}_2^{2-}$  or  $\text{Hg}_2\text{SOH}^+$  (Paquette and Helz 1995, Benoit et al. 1999, Jay et al. 2000, Drott et al. 2007). It has been demonstrated that when dissolved sulphide increases in solution, dissolved mercury tend to increase as well (Benoit et al. 1999). This relationship between sulphate content in soils and mercury bioaccessibility is supported by the following correlations between sulphate content and fractions of mobile mercury in soils ( $n = 5$ ): sulphate content was highly correlated with F1 ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.05$ ), with F2 ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ), and with F1+F2 ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ).

As shown in Figure 1, intestinal bioaccessibility (%CDM I) was strongly correlated with F1+F2 ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ), which indicates that Hg mobility assessed through fractionation is in agreement with Hg bioaccessibility. These results suggest that the water-soluble and exchangeable Hg fraction is a potentially good indicator of mercury bioaccessibility in soils.

### Exposure assessment from soil ingestion

In order to assess health risks associated with ingestion of Hg-contaminated soil, conservative values of mercury intake can be estimated using bioaccessibility values. Intestinal bioaccessibility should be used because Hg absorption occurs mainly in the intestinal tract (Kelley et al. 2002). Considering a soil ingestion rate of 100 mg/d for children under 7 years of age, a mean body weight (BW) of 15.8 kg for 2 to 6 years old children (USEPA, 2006), an exposure frequency of 0.5 (182 d/y), and the bioaccessibility values shown in **Table 2**, a child exposed to soil A, B, or M could ingest up to  $4.7 \times 10^{-4} \mu\text{g Hg/kg (BW)/d}$ . The hazard quotient, calculated by dividing the chemical daily intake ( $4.7 \times 10^{-4} \mu\text{g Hg/kg (BW)/d}$ ) by the oral RfD for mercuric chloride ( $3 \times 10^{-1} \mu\text{g Hg/kg (BW)/d}$ ) (USEPA, 1995) is  $2.10^{-3}$  for soils A and B. A child exhibiting a pica behaviour with a soil ingestion rate of 10 g/d (USEPA, 2006) and exposed to soil A, B, or M could ingest  $4.7 \times 10^{-2} \mu\text{g Hg/kg (BW)/d}$ , which would correspond to a hazard quotient of 0.2. These partial results suggest that field-collected soils A, B, and M would not represent significant health risks for children in case of ingestion.

## **7. Conclusions**

Bioaccessibility of mercury was lower than 3.2% for four of the five soils studied. However, mercury in the reference soil CRM 025-050 had a gastric bioaccessibility of 44.3% and an intestinal bioaccessibility of 34.7%. Nevertheless, the potential oral daily intake of mercury in field-collected soils, calculated using the bioaccessibility determined in vitro, was much lower than the oral RfD for mercuric chloride. Intestinal bioaccessibility increased with the sum of water-soluble and  $\text{CaCl}_2$ -exchangeable mercury fractions but decreased with pH and proportion of fines. Additionally, sulphate content was positively correlated with mercury bioaccessibility in the five-study soils.

The results of the sequential extractions were in agreement with bioaccessibility values measured using the CDM method. In soils A, B, M, and ERM®-CC580, mercury was mainly found in the residual fraction F4 ( $F1+F2+F3 < 4.5\%$  of total Hg), whereas in CRM 025-050 which showed the highest Hg bioaccessibility, the  $\text{CaCl}_2$ -exchangeable Hg (F2) represented nearly 46% of total mercury. Overall, Hg bound to organic matter was a minor fraction of total Hg. Moreover, mercury bioaccessibility was strongly correlated with the sum  $F1+F2$  ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ). These results suggest that the water-soluble and exchangeable Hg fraction is a potentially good indicator of mercury bioaccessibility in soils.

Although the CDM protocol should be further tested for a broad range of field-collected Hg-contaminated soils of different origin, the results are promising. Additionally, the IVG or the SBRC protocol (Rodriguez et al., 1999; Kelley et al., 2002) which are already validated against in vivo data for As, Pb, and Cd, should be compared with the CDM protocol.

## **8. Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

### 9. References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1999) Toxicological Profile for Mercury. Available at <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.html>.
- Akagi H, Nishimura H (1991) Speciation of mercury in the environment. In: Susuki T, Clarkson TW (ed.) Plenum Press. New York, NY, 53-76.
- American Society for Testing Materials (2002) Standard Test Method for Particle-Size Analysis of Soils. D422-63
- Andersson A (1979) Mercury in soils. In: Nriagu JO (ed) Elsevier, North-Holland Biomedical Press.
- Barnett MO, Harris LA, Turner RR, Henson TJ, Melton RE, Stevenson RJ (1995) Characterization of Mercury Species in Contaminated Floodplain Soils. Water, Air, Soil Pollut. 80:1105-1108.
- Barnett MO, Turner RR (2001) Bioaccessibility of Mercury in Soils. Soil. Sediment. Contam. 10:301-316.
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP, Heyes A (1999) Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. Environ. Sci. Technol. 33:951-957.
- Bernaus A, Gaona X, Van Ree D, Valiente M (2006) Determination of Mercury in Polluted Soils Surrounding a Chlor-Alkali Plant - Direct Speciation by X-Ray Absorption Spectroscopy Techniques and Preliminary Geochemical Characterisation of the Area. Anal. Chim. Acta 565:73-80.
- Camp Dresser and Mc Kee Inc. (1992) Almaden Quicksilver County Park Risk Assessment, Final Report, Volume II - Apendices. Denver.
- Canady RA, Hanley JE, Susten AS (1997) ATSDR science panel on the bioavailability of mercury in soils: Lessons learned. Risk Anal. 17:527-532.

- Carter MR (1993) Soil sampling and methods of analysis. Lewis Publishers, Ottawa, ON.
- CEAEQ (1997) Détermination du mercure : dosage par spectrophotométrie d'absorption atomique, formation de vapeur. MA. 200 - Hg 1.0 (1-14).
- Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (1999) 5310B Total Organic Carbon (TOC), High-Temperature Combustion Method. In: Clesceri LS, Greenberg AE and Eaton AD (ed) American Public Health Association. Washington, DC,
- Counter SA, Buchanan LH (2004) Mercury Exposure in Children: a Review. Toxicol. Appl. Pharmacol. 198:209-230.
- David RL (2002-2003) CRC Handbook of Chemistry and Physics. 83, Chemical Rubber Pub. Co., Cleveland, OH.
- Davis A, Bloom NS, Hee SSQ (1997) The Environmental Geochemistry and Bioaccessibility of Mercury in Soils and Sediments: a Review. Risk Anal. 17:557-569.
- Drott A, Lambertsson L, Bjorn E, Skjellberg U (2007) Importance of dissolved neutral mercury sulfides for methyl mercury production in contaminated sediments. Environ. Sci. Technol. 41:2270-2276.
- Gabriel MC, Williamson DG (2004) Principal Biogeochemical Factors Affecting the Speciation and Transport of Mercury Through the Terrestrial Environment. Environ. Geochem. Health 26:421-434.
- Jay JA, Morel FMM, Hemond HF (2000) Mercury speciation in the presence of polysulfides. Environ. Sci. Technol. 34:2196-2200.
- John AD (1999) Table 3.2 Physical Constants of Inorganic Compounds. In: (ed) New York ; Montreal : McGraw-Hill. 3.12- 13.63.
- Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV (2002) Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. Battelle Press, Columbus.

- Maserti BE, Ferrara R (1991) Mercury in plants, soil and atmosphere near a chlor-alkali complex. *Water, Air, Soil Pollut.* 56:15-20.
- Neculita C-M, Zagury GJ, Deschênes L (2005) Mercury Speciation in highly Contaminated Soils from Chlor-Alkali Plants Using Chemical Extractions. *J. Environ. Qual.* 34:255-262.
- Nusslein F, Feicht EA, Schulte-Hostede S, Seltmann U, Kettrup A (1995) Exposure analysis of the inhabitants living in the neighbourhood of a mercury-contaminated industrial site. *Chemosphere* 30:2241-2248.
- Paquette K, Helz G (1995) Solubility of Cinnabar (Red Hgs) and Implications for Mercury Speciation in Sulfidic Waters. *Water, Air, Soil Pollut.* 80:1053-1056.
- Paustenbach DJ, Bruce GM, Chrostowski P (1997) Current Views on the Oral Bioavailability of Inorganic Mercury in Soil: Implications for Health Risk Assessments. *Risk Anal.* 17:533-544.
- Pouschat P, Zagury GJ (2006) In Vitro Gastrointestinal Bioavailability of Arsenic in Soils Collected Near Cca-Treated Utility Poles. *Environ. Sci. Technol.* 40:4317-4323.
- Pouschat P, Zagury GJ (2008) Bioaccessibility of chromium and copper in soils collected near CCA-treated wood poles. *Pract. Periodical of Haz., Toxic, and Radioactive Waste Mgmt.*, ASCE In Press:
- Revis N, Holdsworth G, Bingham G, King A, Elmore J (1989a) An Assessment of health risk associated with mercury in soil and sediment from East Fork Poplar Creek, Oak Ridge, Tennessee. Final report.
- Revis NW, Osborne TR, Holdsworth G, Hadden C (1989b) Distribution of Mercury Species in Soil From a Mercury-Contaminated Site. *Water, Air, Soil Pollut.* 45:105-113.
- Revis NW, Osborne TR, Holdsworth G, Hadden C (1990) Mercury in Soil - a Method for Assessing Acceptable Limits. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19:221-226.

- Rodrigues S, Pereira ME, Duarte AC, Ajmone-Marsan F, Davidson CM, Grcman H, Hossack I, Hursthouse AS, Ljung K, Martini C, Otabbong E, Reinoso R, Ruiz-Cortes E, Urquhart GJ, Vrscaj B (2006) Mercury in urban soils: A comparison of local spatial variability in six European cities. *Sci. Total Environ.* 368:926-936.
- Rodriguez RR, Basta NT, Casteel SW, Pace LW (1999) An in Vitro Gastrointestinal Method to Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environ. Sci. Technol.* 33:642-649.
- RTC (2006) Loamy Sand - Trace Metals Available at <http://www.rtc-corp.com/products/n1064.aspx>.
- Sakamoto H, Tomiyasu T, Yonehara N. (1995) The content and chemical forms of mercury in sediments from Kagoshima Bay, in comparison with Minamata Bay and Yatsushiro Sea, southwestern Japan. *Geochem. J.* 29:97-105.
- Schoof RA, Nielsen JB (1997) Evaluation of Methods for Assessing the Oral Bioavailability of Inorganic Mercury in Soil. *Risk Anal.* 17:545-555.
- Schuster E (1991) The Behavior of Mercury in the Soil With Special Emphasis on Complexation and Adsorption Processes - a Review of the Literature. *Water, Air, Soil Pollut.* 56:667-680.
- Sobek AA, Schuller WA, Freeman JR, Smith RM (1978) Field and laboratory Methods Applicable to Overburdens and Minesoils. EPA-600/2--78-054 (60-62).
- Soil Survey Division Staff (1993) Soil Survey Manual. Available at <http://soils.usda.gov/technical/manual/contents/chapter3e.html>.
- U.S Department of Energy (1994) East Fork Poplar Creek Sewer Line Beltway Remedial Investigation Report. Oak Ridge, Tennessee.
- USEPA (1995) Mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) (CASRN 7487-94-7). Available at <http://www.epa.gov/iris/subst/0692.htm>.

USEPA (1997) Volume V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds. Available at <http://www.epa.gov/mercury/report.htm>.

USEPA (1997) Volume IV: An Assessment of Exposure to Mercury in the United States. Available at <http://www.epa.gov/mercury/report.htm>.

USEPA (2006) Child-Specific Exposure Factors Handbook (External Review Draft). Available at <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=56747>.

USEPA (2007) Framework for Metals Risk Assessment. Available at <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=167607>.

Zagury GJ, Neculita C-M, Bastien C, Deschênes L (2006) Mercury fractionation, bioavailability, and ecotoxicity in highly contaminated soils from chlor-alkali plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 25:1138-1147.



## 10. Tables

**Table 1** Physicochemical characteristics of soils (<2 mm) and reference materials  
(n = 3)

Samples	Total Hg <sup>a</sup>	pH	Total Carbon	Organic Carbon <sup>b</sup>	Total Sulfur	Sulfate content	Fines <80 µm
	mg.kg <sup>-1</sup>		g.kg <sup>-1</sup> of dry soil				%
CRM 025-050	83.5 ± 8.3	7.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	14.1 ± 1.2	10.5 ± 0.7	11.9 ± 0.3	8.8 ± 0.9	19
ERM <sup>®</sup> -CC580	111.0 ± 7.3	8.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	115.3 ± 2.1	37.0 ± 5.7	3.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	84
Soil A	15.2 ± 0.5	7.3 ± 0.1	26.4 ± 0.2	6.9 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.1	48
Soil B	6.6 ± 0.6	7.8 ± 0.1	15.3 ± 0.2	12.0 ± 0.7	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	71
Soil M	4.3 ± 0.2	9.7 ± 0.0	25.1 ± 0.9	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	0.1 ± 0.0	84

<sup>a</sup> Total Hg determinations were performed on bulk reference materials and on sieved (<250 µm) soil samples

<sup>b</sup> n = 2

**Table 2** Bioaccessibility of Hg in eight different samples measured by the CDM in vitro method <sup>a</sup> (n = 3)

Samples	Bioaccessible Hg Gastric (%)	Bioaccessible Hg Intestinal (%)
HgCl <sub>2</sub>	99.7 ± 7.3	88.6 ± 8.3
HgS	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Kaolin + HgCl <sub>2</sub>	99.5 ± 9.9	91.8 ± 22.5
ERM <sup>®</sup> - CC580	< 0.12 <sup>b</sup>	< 0.13 <sup>b</sup>
CRM 025-050	44.3 ± 2.8	34.7 ± 0.4
Soil A	< 0.93 <sup>b</sup>	< 1.02 <sup>b</sup>
Soil B	< 2.11 <sup>b</sup>	< 2.32 <sup>b</sup>
Soil M	< 3.14 <sup>b</sup>	< 3.15 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> CDM method as used for EFPC study (Barnett and Turner 2001)

<sup>b</sup> MDL was 0.1 µg/L

**Table 3** Mercury fractionation in certified reference materials and in field-collected contaminated soils (n = 3)

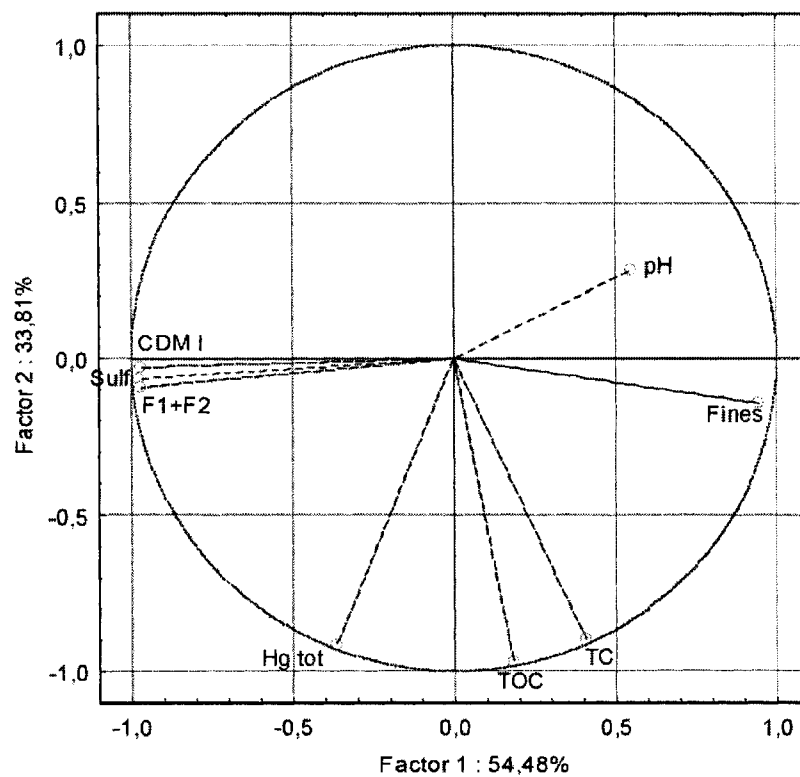
Samples	Total Hg <sup>b</sup>		Fraction 1, water-soluble		Fraction 2, exchangeable		Fraction 3, organic		Fraction 4, residual		Sum	Recovery <sup>c</sup>
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
CRM 025-050	81.8 ± 0.4	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	37.5 ± 15.2	45.8 ± 18.6	2.9 ± 0.3	3.5 ± 0.4	54.6 ± 5.5	67 ± 7	96.6 ± 16.2	118 ± 17	
ERM <sup>®</sup> -CC580 <sup>a</sup>	102.8 ± 2.1	0.8 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	105.0 ± 7.1	102 ± 7	107.3 ± 7.1	104 ± 7	
Soil A	12.1 ± 0.6	0.01 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.02 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.07 ± 0.0	0.6 ± 0.0	12.1 ± 1.1	100 ± 9	12.2 ± 1.1	101 ± 1	
Soil B	5.9 ± 0.4	0.01 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.01 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.07 ± 0.0	1.2 ± 0.1	5.9 ± 0.3	101 ± 5	6.0 ± 0.3	103 ± 9	
Soil M	2.6 ± 0.2	0.02 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.02 ± 0.0	1.0 ± 0.4	0.12 ± 0.0	4.5 ± 0.4	2.6 ± 0.1	100 ± 2	2.8 ± 0.1	107 ± 2	

<sup>a</sup> The sequential extraction procedure was performed in duplicate for this sediment reference material

<sup>b</sup> For total Hg, the number of determinations (n) differs between samples: n = 3 for soils A, B, and M, n = 2 for CRM 025-050, and n = 3 for ERM<sup>®</sup>-CC-580

<sup>c</sup> Calculated as (sum of extracted Hg fractions/total Hg)×100

# 11. Figures



**Figure 1** Principal Component Analysis applied to soil properties, intestinal bioaccessibility and sum of fractions F1 and F2